Aus der Chirurgischen Klinik Bad Cannstatt
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Fischer

Untersuchungen zur Immunogenität von nativem und modifiziertem carcinoembryonalen Antigen (CEA) in STU-Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Staab
aus Schöllkrippen

1979

Aus der Chirurgischen Klinik Bad Cannstatt
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Fischer

Untersuchungen zur Immunogenität von nativem und modifiziertem carcinoembryonalen Antigen (CEA) in STU-Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Staab
aus Schöllkrippen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. N. Schwenzer
Berichterstatter: Professor Dr. R. Fischer
(Professor Dr. L. Koslowski)

Inhaltsverzeichnis Seite

I. Einleitung 1
II.Ergebnisse 5
A.Isolierung des Carcinoembryonalen Antigens 5
1.) Biologisches Ausgangsmaterial 5
2.) CEA Präparation nach Coligan und Rosai 6
3.) Entwicklung eines verbesserten 5-Stufenverfahrens zur Präparation von ^{C}EA 9
4.) Charakterisierung des nach dem verbesserten 5-Stufenverfahren präparierten Carcioembryonalen Antigens 16
B.Modifikation des Carcinoembryonalen Antigens 22
1.) Enzymatische Modifikation des CEA 22
2.) Chemische Modifikation des CEA 22
C. Immunogenität des nativen und der modifizierten CEA Präparate in Mäusen 32
1.) In vivo Immunreaktior nach intradermaler Zweitinjektion von nativem CEA 36
2.) In vivo Immunreaktion nach intradermaler Zweitinjektion von modifiziertem CEA 47
3.) Einfluß der Mehrfachimmunisierung auf die in vivo Immunreaktion 5o
4.) Abhängigkeit der zellulären Immunreaktion vom Grad der Modifikation des CEA 53
5.) Serologische Untersuchungen 55
III. Diskussion 57
IV. Zusammenfassung 61
V. Material und Methoden 63
VI. Literatur 71

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0002

I. Einleitung

Bei der Erkennung maligner Zellen im Organismus spielen immunologische Mechanismen zellulären und humoralen Typs eine große Rolle. Aus zahlreichen Experimenten ist bekannt, daß die Kontrolle des neoplastischen Wachstums von einer intakten Antitumorimmunität abhängig ist. Beeinflußt wird diese immunologische Überwachung durch lösliche Faktoren im Serum, die die Antitumorimmunität blockieren und so zum Versagen immunologischer Abwehrmechanismen führen. Solche Faktoren sind entweder sezernierte Antigene der Tumoren oder stellen Antigen-Antikörper-Komplexe von Tumorantigenen dar (3,2o).

In tierischen Tumorsystemen wurden sowohl bei chemisch als auch bei virologisch induzierten Tumoren Antigene dieser Tumoren, sogenannte Neoantigene, auf den Zelloberflächen nachgewiesen (2,24, 37). Auch bei den malignen Tumoren des Menschen zweifelt heute niemand mehr am Auftreten von Neoantigenen als besonderes Kennzeichen maligne entarteter Zellen. In vielen Fällen konnten solche Neoantigene auch bei menschlichen Tumoren bereits aufgefunden werden (6,15,21,25).
Immunologisch können auf den Zelloberflächen der Tumorzellen eine ganze Reihe von verschiedenen Tumorantigenen unterschieden werden. Man kann Antigene nachweisen, die für den jeweiligen Tumor streng spezifisch sind und man findet Antigene, die bei einer großen Anzahl von verschiedenen Tumoren nachweisbar sind. Zu der ersten Gruppe zählen die individuellen tumorspezifischen Transplantationsantigene (TSTA = Tumorspezifisches Transplantationsantigen, TSSA = Tumorspezifische Surface Antigene). Diese Antigene sind maßgeblich für die Induktion einer immunologischen Tumorabwehr des Organismus verantwortlich.

Eine andere Gruppe von Neoantigenen stellen die tumorassoziierten Antigene (TAA) dar.

Zu der Gruppe der tumorassoziierten Antigene zählen im allgemeinen die oncofötalen Antigene. Oncofötale Antigene sind dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht nur bei der malignen Transformation einer Zelle auftreten, sondern daß sie, häufig organspezifisch, während bestimmter Phasen in der Embryonalzeit, als normale Bestandteile der Embryonalzelloberflächen nachweisbar sind. In ausdifferenzierten Zellen sind diese Antigene in der Regel nicht nachweisbar, sie können jedoch bei maligner Entartung der Zellen wieder gebildet werden. Es gibt oncofötale Antigene, die zudem noch von den Tumorzellen in die umgebende Flüssigkeit sekretiert werden und sich infolge dessen im Blut direkt nachweisen lassen. Ein solches Antigen ist das carcinoembryonale Antigen (CEA), das erstmals von Freedman und Gold 1965 nachgewiesen wurde (18). In den letzten Jahren ist das CEA weitgehend charakterisiert worden, insbesondere deshalb, weil es zunächst als spezifisches diagnostisches Mittel zur Früherkennung von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes galt (16,29,45). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß dieses Antigen auch in sehr geringen Mengen auf der Oberfläche von normalen Zellen vorhanden ist. Bei der Transformation einer normalen Zelle zu einer malignen Zelle wird CEA quantitativ vermehrt in der Glykokalix der Tumorzellen gefunden und von den Zellen verstärkt sekretiert.
Von großem Interesse für die Immunologie ist stets die Immunogenität dieser Antigene im Organismus. Die Immunantwort auf ein Immunogen besteht in der Regel aus zwei voneinander verschiedenen Typen von Immunreaktionen, einer zellulären und einer humoralen Immunreaktion. Diese

beiden Haupttypen von Immunreaktionen spielen in der Tumorimmunologie eine große Rolle. Es ist bekannt, daß cytotoxische zelluläre Immunreaktionen auf Tumorantigene verantwortlich sind für die immunologische Überwachung im Organismus. So erweisen sich die TSTA hauptsächlich verantwortlich für eine Tumorabstoßung (7), während die tumorassoziierten oncofötalen Antigene in der Regel nur eine schwache Immunogenität besitzen (3o). In einzelnen Fällen konnte gezeigt werden, daß auch oncofötale Antigene eine Tumorabstoßung bewirken können (4, 5, 1o). Das carcinoembryonale Antigen scheint keine ausgeprägten Fähigkeiten aufzuweisen, Immunmechanismen in Gang zu setzen (16,31), hingegen fanden mehrere Untersucher, daß in Seren von krebskranken Patienten humorale Antikörper gegen CEA vorhanden sind, andere Untersucher jedoch konnten diese Antikörper nicht nachweisen (14,17,23,33).

Von tierexperimentellen Untersuchungen weiß man, daß humorale Antikörper zur Tumorabstoßung im Organismus wenig beitragen, daß vielmehr bei Auftreten von Antikörpern gegen Tumorzellen eine Förderung des Tumorwachstums (Tumorenhancement) beobachtet werden kann (19). Eine selektive Steuerung des Typs der Immunantwort wäre insbesondere in der Tumorimmunologie deshalb von entscheidender Bedeutung.
In einer Reihe von Studien mit Proteinantigenen wurde der Nachweis erbracht, daß durch chemische Modifikation der Antigene eine gezielte Steuerung der Immunreaktion erreicht werden kann (38,39,42,46). So gelang durch Einführung aliphatischer Methylgruppen in das Hüllenprotein des Tabak-Mosaik-Virus (TMV) die Induktion von zellulären Immunreaktionen bei teilweiser Unterdrückung der humoralen Immunreaktion gegen dieses Antigen in STU-Mäusen.
Bei Tumorschutzversuchen mit Mäusen war es möglich, durch

chemische Modifikation der Tumorzellen, die Immunogenität dieser Zellen entscheidend zu erhöhen, so daß gegenüber einem Tumortransplantat von 1ooo - 1oooo-facher Lethaldosis bis zur 4o% Tumorfreiheit erzielt wurde (43). Der erreichte Tumorschutz konnte auf zelluläre Immunreaktionen zurückgeführt werden, da humorale Antikörper nicht nachweisbar waren. Ebenso konnte dieser Typ von Immunreaktion nach chemischer Modifikation von Zellmembranen erzeugt werden (44).

Aufgabe dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob durch chemische Modifikation des Glykoproteins CEA die Immunogenität dieses tumorassoziierten Antigens erhöht werden kann und eine selektive Steuerung der Immunreaktion zu erzielen ist. Als Ausgangsmaterial diente menschliches Tumorgewebe des Gastrointestinaltrakts bzw. deren Metastasen. Das CEA wurde soweit gereinigt, daß chemische Modifikationsversuche damit unternommen werden konnten. Von den verschiedenen möglichen Modifikationsreaktionen wurde die Umsetzung mit Dimethylsulfat,Glutaraldehyd und die Methylamidierung benutzt. Daneben kam noch die Acetylierung, Laurylierung und die Behandlung mit Neuraminidase zur Anwendung. Die Abschätzung der auf dem CEA zur Reaktion gebrachten Gruppen wurde auf der Basis von Sättigungskurven mit Hilfe von radioaktiven Reagenzien ermittelt. Die Immunogenität der Präparate wurde sowohl in vivo als auch in vitro in STU-Mäusen mit nativem CEA verglichen. Darüber hinaus wurden Versuche zur Dosisabhängigkeit der Immunogenität der CEA-Präparate durchgeführt.

II. Ergebnisse

A. Isolierung des carcinoembryonalen Antigens

1.) Biologisches Ausgangsmaterial

CEA ist in einer Reihe biologischer Ausgangsmaterialien zu finden. So enthält embryonale Darmschleimhaut und gastrointestinales Tumorgewebe CEA. Auch in Körperflüssigkeiten wie Plasma und Ascites von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen ist CEA in unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Besonders hohe Konzentrationen dieses Glykoproteins sind in Lebermetastasen kolorektaler Tumoren vorhanden (45).

Für diese Untersuchungen wurden operativ gewonnene Primärtumoren und Lebermetastasen von Adenokarzinomen des Magens, des Pankreas, des Kolons und des Rektums gesammelt und in der Folge zur Präparation des CEA verwendet. Innerhalb 1 - 2 Stunden nach chirurgischer Entnahme exzidierte man das Tumorgewebe vom umgebenden Normalgewebe, nekrotisches Tumormaterial wurde dabei verworfen. Die Masse der so präparierten Karzinome betrug zwischen 5 und 3oo g, wobei Magenkarzinome generell die höchsten Einzelgewichte aufwiesen. Die präparierten Lebermetastasen wogen zwischen 5 und 65oo g. Die Tumorpräparate wurden dann nach Organen sortiert und bis zur Aufarbeitung bei -7o ^{o}C aufbewahrt. Zu einer Tumoraufarbeitung benötigte man mindestens 25o - 1ooo g Tumorgewebe. Das Gesamtgewicht von 1ooo g Tumormasse entsprach durchschnittlich 12 individuellen Magenkarzinomen oder 3o individuellen Kolonkarzinomen.

Zu Anfang der Untersuchungen wurden im wesentlichen Primärtumoren aufgearbeitet, im späteren Verlauf der Arbeit dagegen Lebermetastasen koloreaktaler Karzinome , da diese den höchsten Gehalt an CEA aufwiesen.

2.) CEA-Präparationen nach Coligan und Rosai

Es wurden zunächst 2 bekannte Methoden zur Isolierung von CEA im Vorversuch durchgeführt. Die ursprünglich von Krupey et al (26,27,28) beschriebene und von Coligan et al. (11) adaptierte Methode zur Gewinnung von CEA unterscheidet sich in ihrer Präparationstechnik weitgehendst von der CEA-Isolierung nach Rosai et al. (41). Bei der Isolierung von CEA nach Coligan wird das Glykoprotein durch Perchlorsäure extrahiert, unter gleichzeitiger Präzipitation der meisten anderen Proteine; bei der Methode nach Rosai gewinnt man zunächst eine Membranfraktion aus der dann mit Lithiumdijodsalicylat das Antigen aus dem Membrankomplex abdissoziiert wird. Die beiden Präparationsmethoden sind in Abbildung 1a und 1b wiedergegeben.

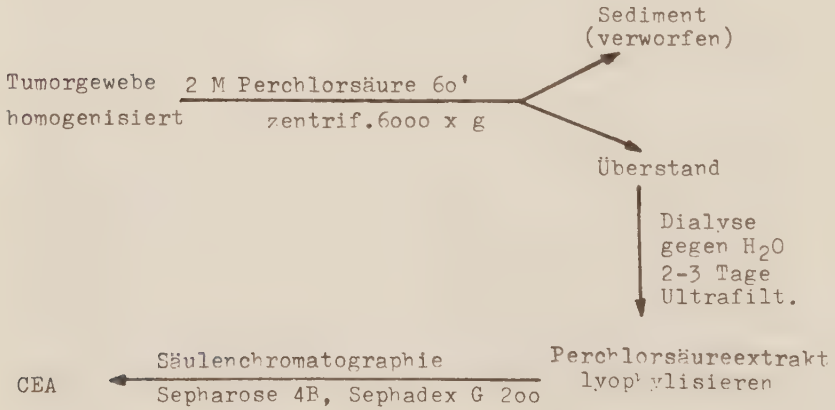


Abbildung 1 a: CEA-Präparation nach Coligan

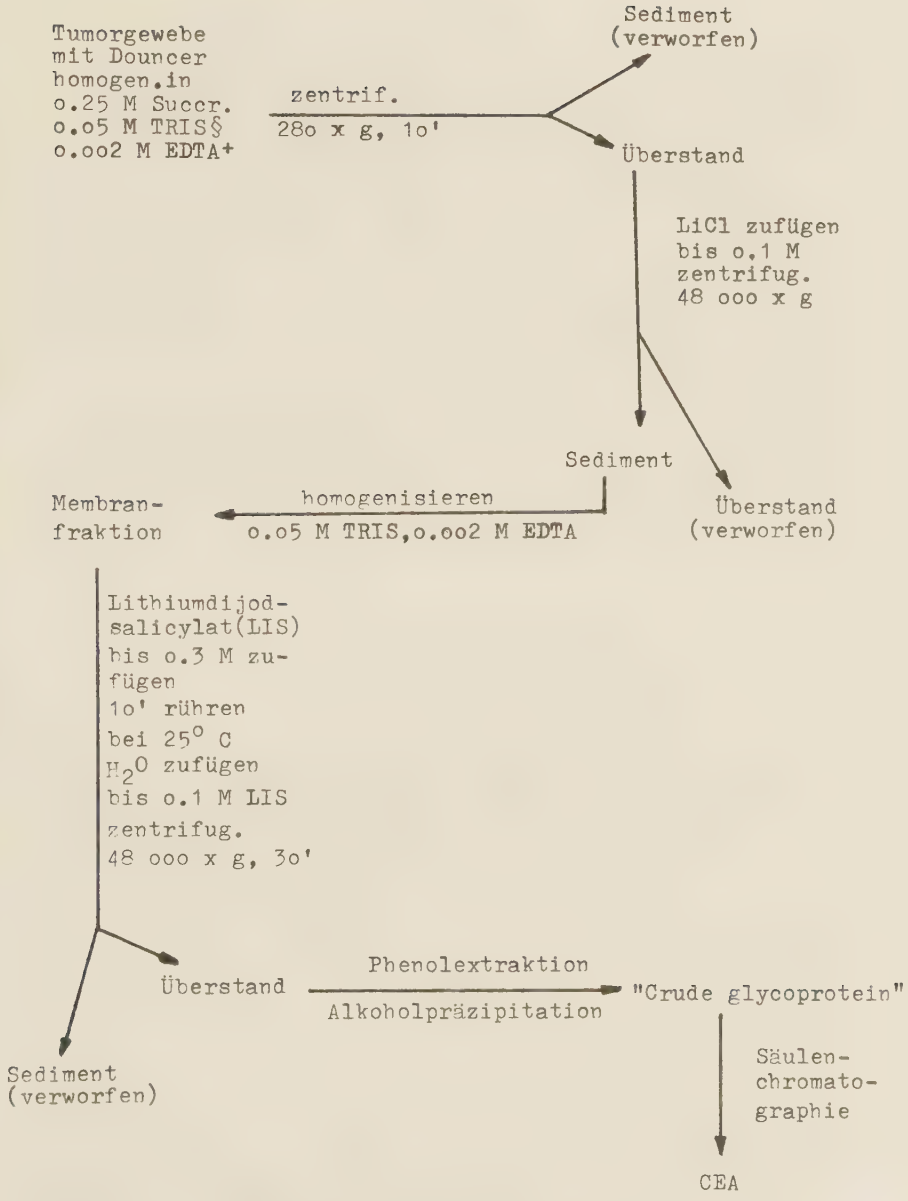


Abbildung 1 b: CEA-Präparation nach Rosai
+: Äthylentetraaminoessigsäure (EDTA)
§: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(TRIS)

Vorteile der Isolationsmethode nach Rosai liegen in der schnellen Präparation des CEA bis zum "crude glycoprotein", nachteilig dagegen wiegen der relativ hohe Anteil an Nukleinsäuren im CEA-Präparat sowie der hohe Preis des Lithiumdijodsalicylats. Die Methode nach Coligan bietet den Vorteil einer wenig komplizierten Präparation, die jedoch durch ausgedehnte Dialyseschritte erheblich längere Zeit bis zur Säulenchromatographie beansprucht, wodurch es insbesondere im sauren Milieu nach der Perchlorsäureextraktion zum partiellen Abbau der Kohlenhydratseitenketten des Glykoproteins kommen kann.
Die Vorversuche, 2 Primärtumoraufarbeitungen nach Coligan und 1 Aufarbeitung nach Rosai, sind in der Tabelle 1 wiedergegeben. Die Gesamtausbeuten an CEA bezogen auf den Gehalt im CEA-Rohextrakt sind der Gesamtmasse an aufgearbeitetem Tumormaterial gegenübergestellt.

Tabelle 1: Aufgearbeitete Primärtumormasse und CEA Ausbeuten bei CEA-Präparationen nach der Methode von Coligan und Rosai

Aufarbeitung	aufgearbeitete Gesamttumormasse	CEA vor Säulenchromatographie	CEA nach Säulenchromatographie
Rosai	858 g	19,4 mg	6,1 § mg
Coligan 1	770 g	7,8 mg	1,7 mg
Coligan 2	250 g	4,9 mg	0,62 mg

§ : Enthält noch Spuren von Nukleinsäuren

3.) Entwicklung eines verbesserten 5-Stufen-Verfahrens zur Präparation von CEA

Die relativ schlechten Ausbeuten an CEA, sowie schwer abtrennbare Verunreinigungen im Endpräparat bei den Vorversuchen, veranlassten die Entwicklung einer eigenen präparativen Methode zur Darstellung von CEA. Insbesondere mußte die langwierige Dialyse nach der Perchlorsäureextraktion stark eingeschränkt werden, um die Hydrolyse glykosidischer Bindungen bei saurem pH zu vermeiden. Zur Präparation dienten in der Folge nur noch Lebermetastasen primärer kolorektaler Karzinome. Alle anfallenden Präparationsschritte wurden bei 4° C im Kühlraum durchgeführt. Die Anreicherung des CEA wurde radioimmunologisch verfolgt (47). Ein Schema des 5-Stufen-Verfahrens ist in Abbildung 2 (Seite 12) aufgeführt.

Verfahren

1. Stufe:

Extraktion des Tumorgewebes mit 1 molarer Kochsalzlösung

Die Lebermetastasen wurden in kleine Stücke geschnitten, durch den Fleischwolf gedreht und der resultierende Gewebebrei mit dem gleichen Volumen 1 M Kochsalzlösung im Starmix homogenisiert. Danach extrahierte man unter Zugabe eines weiteren Volumens 1 M Kochsalzlösung noch zusätzliche 2 - 3 Stunden. Nach Sedimentation des CEA-Rohextrakts bei 3000 x g kam nur der klare Überstand zur weiteren Präparation, das Sediment wurde verworfen.

2.Stufe:

Perchlorsäurebehandlung des Überstandes des CEA Rohextrakts

Nach 3 - 5-stündiger Dialyse des Überstandes gegen Wasser zur Entfernung des Kochsalzes, wurde zu je einem Volumen Überstand ein Volumen 2 M Perchlorsäure zugetropft, das

Gemisch noch eine Stunde gerührt und bei 3ooo x g zentrifugiert. Nach Abdekantierung des Überstandes und Verwerfen des Sedimentes wurde sofort mit festem TRIS (TRIS-Hydroxymethylaminomethan) neutralisiert, um einen Abbau der Kohlenhydratseitenketten des CEA bei saurem pH weitgehendst zu vermeiden.

3. Stufe:

Ammonsulfatpräzipitation des CEA

Nach Dialyse und Einengung des Überstandes durch Ultrafiltration wurde dann eine Ammonsulfatfällung durchgeführt. Während der Ultrafiltration ausfallendes Material wurde bei 29,ooo x g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Nach Sättigung des Retentats der Ultrafiltration mit Ammonsulfat und vollständiger Fällung des CEA, wurde das CEA durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Man löste das CEA sofort in o,o2 M Tris-HCL Puffer pH 7,2 und fror dann das CEA portionsweise bei -2o° C ein. Der Überstand der Ammonsulfatfällung wurde verworfen.

4. Stufe:

Säulenchromatographische Trennungen des Ammonsulfatpräzipitats

Die weitere Reinigung des CEA erfolgte durch Molekularsiebverfahren. Diese Reinigungsschritte eignen sich vorzüglich zur Abtrennung des CEA von noch vorhandenen Nucleinsäuren, vom sogenannten NCA sowie von anderen verunreinigenden Proteinen.
Die weitere Anreicherung des CEA erfolgte zunächst über eine 16o x 6,5 cm Säule mit LKB AcA 22 Gel. Das Polyacrylamidgel ist besonders gut geeignet für die Fraktionierung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 1oo ooo - 1 2oo ooo. Bei einem Säulenlauf konnten etwa 4oo - 5oo mg

des Ammonsulfatpräzipitats aufgetrennt werden. Zur Elution diente ein o.o2 M TRIS-HCL Puffer mit o.o1% Natriumazid. Abbildung 3(Seite 15) gibt das Elutionsprofil des CEA Ammonsulfatpräzipitats mit 4 Extinktionsmaxima. Wie aus Abbildung 3 ersehbar, wurden entsprechend der Protein- und der CEA-Aktivitätsverteilung 7 Fraktionen gebildet, wobei die Hauptmenge des CEA in Fraktion 4 bestimmt wurde.

5. Stufe:

Rechromatographie der CEA-haltigen Fraktionen

Die Fraktionen 3, 4, 5 wurden über eine 9o x 2 cm Säule mit LKB AcA 22 Gel rechromatographiert. Zur Elution der Säule diente auch hier der o.o2 M TRIS-HCL Puffer pH 7,2 mit o.o1% Natriumazid. Typische Fraktionierungsprofile sind für die Rechromatographie der Fraktionen 3,4 und 5 in Abbildung 4(S.15)gegeben.Entsprechend der CEA-Verteilung wurden die CEA-haltigen Fraktionen gesammelt und durch Ultrafiltration auf ca. 1 mg/ml konzentriert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -2o^{o} C eingefroren.

Ausbeuten und Anreicherung des nach dem verbesserten 5-Stufenverfahren präparierten CEA

Die Ausbeuten der CEA Präparationen waren sehr unterschiedlich und abhängig vom ursprünglich in den Metastasen vorhandenem CEA. Im Vergleich zu den CEA Aufarbeitungen aus Primärtumoren findet man eine weit grössere Ausbeute an CEA, da der Gehalt der Lebermetastasen um 1o-2o mal höher war. So betrug die CEA Konzentration bei 4 verschiedenen Lebermetastasenaufarbeitungen zwischen o,o1% und o,o25%. Die CEA-Ausbeute berechnete sich bis zur Stufe des CEA Ammonsulfatpräzipitats auf durchschnittlich etwa 63%, nach den weiteren säulenchromatographischen Reinigungsschritten etwa 34% der theoretischen Ausbeute. Die Ausbeuten der einzelnen CEA Präparationen sind in Tabelle 2 aufgeführt (Seite 13).

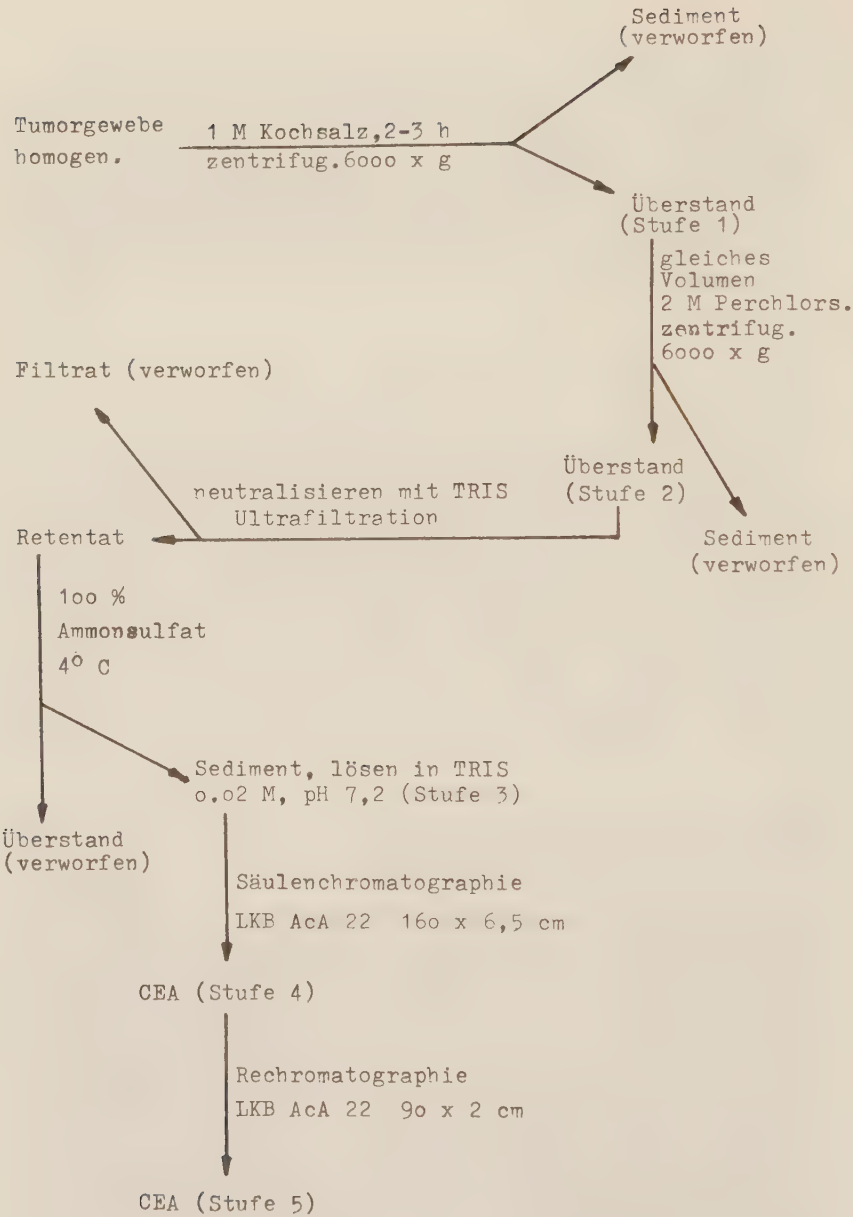


Abbildung 2: CEA-Präparation nach dem verbesserten 5-Stufen-Verfahren

Tabelle 2: CEA-Gehalt und CEA-Ausbeuten bei 4 verschiedenen Lebermetastasenaufarbeitungen

Lebermetastasen-aufarbeitung	Gesamtmassen an Tumorgewebe (g)	CEA-Gehalt Probeextrakt (mg)	CEA-Gehalt Ammonsulfatfällung (mg)	Prozent der theoretischen Ausbeuten	CEA-Gehalt nach Säulenchromatographie (mg)	Prozent der theoretischen Ausbeuten
1	2100	302	215	71	126	42
2	3500	390	218	56	92	24
3	2600	648	463	71	253	39
4	3800	692	364	53	221	32

Die Anreicherung des CEA vom Rohextrakt bis zum Ammonsulfatpräzipitat betrug ca. 1000- 2000fach, die darauffolgende säulenchromatographische Reinigung erreichte eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivität um den Faktor 10-15. In der Tabelle 3 ist die CEA-Anreicherung einer typischen Lebermetastasenaufarbeitung wiedergegeben.

Tabelle 3: Anreicherungsschema einer typischen Lebermetastasenaufarbeitung nach dem verbesserten 5-Stufen Verfahren

Präparationsstufe	Volumen	Protein (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	CEA (mg/ml)	CEA Gesamt (mg)	spez. Aktivität $\frac{\text{mg CEA}}{\text{mg Protein}} \times 10^{-3}$
1.	13 l	63	819×10^{3}	0.0023	302	0,036
2.	10,3 l	0,6	$6,18 \times 10^{3}$	0.0213	220	35,5
3.	90 ml	30,4	$2,7 \times 10^{3}$	2,4	215	79,[illegible]
4.	150 ml	1,23	185	0.950	142,5	770
5.	119 ml	1,1	130,9	1.0625	126,4	965

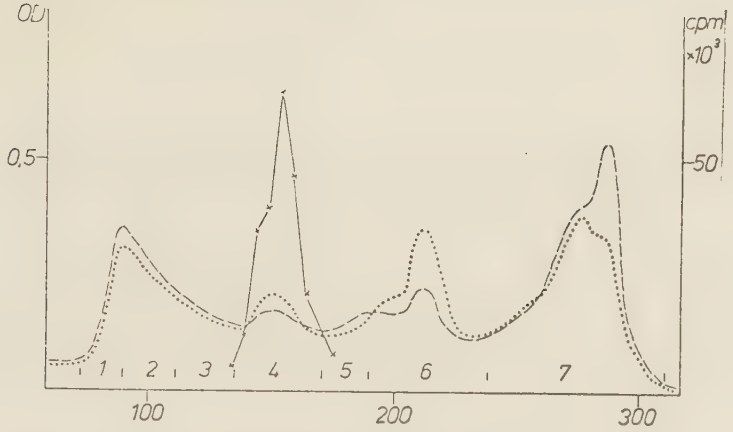


Abbildung 3: Säulenchromatographische Trennung des CEA-Ammonsulfatpräzipitats über eine 160 x 6,5 cm AcA 22 Säule – – – oD260, ●●● oD280, xxxx = CEA-Aktivität

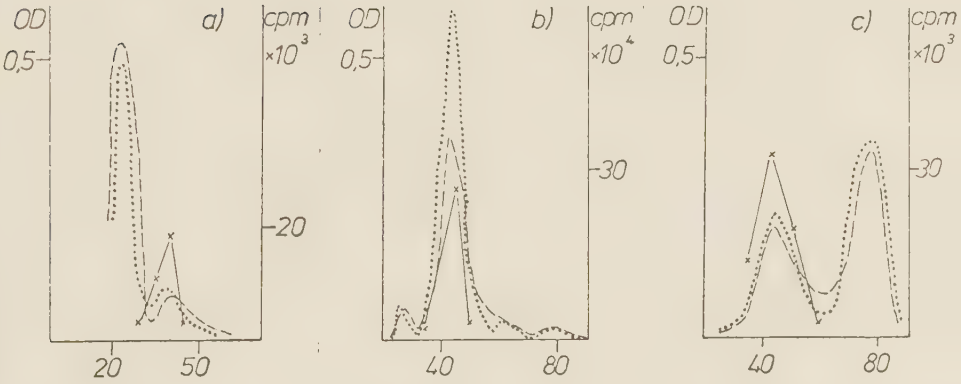


Abbildung 4: Rechromatographie der CEA-haltigen Fraktion 3,4,5 über eine 90 x 2,5 cm LKB AcA Säule.
a) Fraktion 3, b) Fraktion 4, c) Fraktion 5
– – – oD 260, ●●● oD 280, xxx = CEA-Aktivität

4.) Charakterisierung des nach dem verbesserten 5-Stufen Verfahren präparierten carcinoembryonalen Antigens

Die Immunisierung von Tieren mit Proteinantigenen erfordert ein besonders hochgereinigtes Proteinpräparat, da auch geringe Mengen andere Proteine mit immunogenen Eigenschaften, insbesondere bei der Sekundärimmunisierung Anlaß zu Immunreaktionen geben, die leicht fehlinterpretiert werden können. Der Charakterisierung des nach dem verbesserten 5-Stufen Verfahren präparierten CEA kam deshalb besondere Bedeutung zu, da außer den immunologischen Experimenten auch die chemischen Modifikationsreaktionen mit dem CEA ein einheitliches CEA Präparat notwendig machten, das nicht durch andere Glykoproteine, wie beispielsweise NCA verunreinigt war.
Zur Charakterisierung des CEA wurden verschiedene physikalische, chemische und immunologische Reinheitskriterien herangezogen. Zum einen diente die Polyacrylamidgelelektrophorese und das Molekularsiebverfahren als Parameter für die analytische Reinheit des CEA. Auf der Basis der Aminosäurenzusammensetzung wurde ein Vergleich der chemischen Zusammensetzung des präparierten CEA mit dem CEA des British Bureau of Standards durchgeführt.(29). Diese quantitative Auswertung erlaubte darüberhinaus eine Abschätzung des Kohlenhydratanteils des präparierten CEA.

a) Charakterisierung des CEA durch Sephadexgelchromatographie

Zur Gelchromatographie des CEA diente eine Sephadex G 2oo Säule (37 x 5 cm). Die Gelfiltration erlaubte neben dem Nachweis der molekularen Einheitlichkeit des Materials eine Abschätzung des Molekulargewichts des CEA. Das im 5-Stufen Verfahren präparierte CEA zeigte ein symmetri-

sches Elutionsprofil. Weitere Extinktionsmaxima traten nicht auf, so daß nach diesen säulenchromatographischen Kriterien ein nach der Molekulargrösse homogenes Material vorliegen müsste.
Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden Säulenläufe mit Standardproteinen von bekanntem Molekulargewicht nach der Methode von P. Andrews durchgeführt (1). CEA eluierte von der G 2oo Säule zwischen dem IgM/Ferritin und dem IgG Extinktionsmaximum. Anhand der hergestellten Eichkurve wurde ein Molekulargewicht von 2oo ooo ermittelt.

b) Charakterisierung des CEA durch SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird gerne zur Überprüfung der analytischen Reinheit von Proteinen, sowie zu genaueren Molekulargewichtsbestimmungen herangezogen. Alle Untersuchungen des CEA wurden mit 5% SDS-Gelen durchgeführt. Die Densitometerdiagramme in Abbildung 5a, b, c geben einen Überblick über die Anreicherung sowie die chemische Reinheit des CEA in den Präparationsstufen 3, 4 und 5 einer typischen Leberaufarbeitung. Wie man sieht, besteht das Densitogramm des CEA der Präparationsstufe 5 aus einer einzigen Bande und ist nach elektrophoretischen Kriterien als rein zu betrachten, hingegen ist das CEA-Präparat der Stufe 4 noch mit geringen Mengen eines anderen Proteins(MG: ca. 6o ooo) verunreinigt. Anhand einer Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung konnte ein Molekulargewicht von ca. 18o ooo für das CEA ermittelt werden.

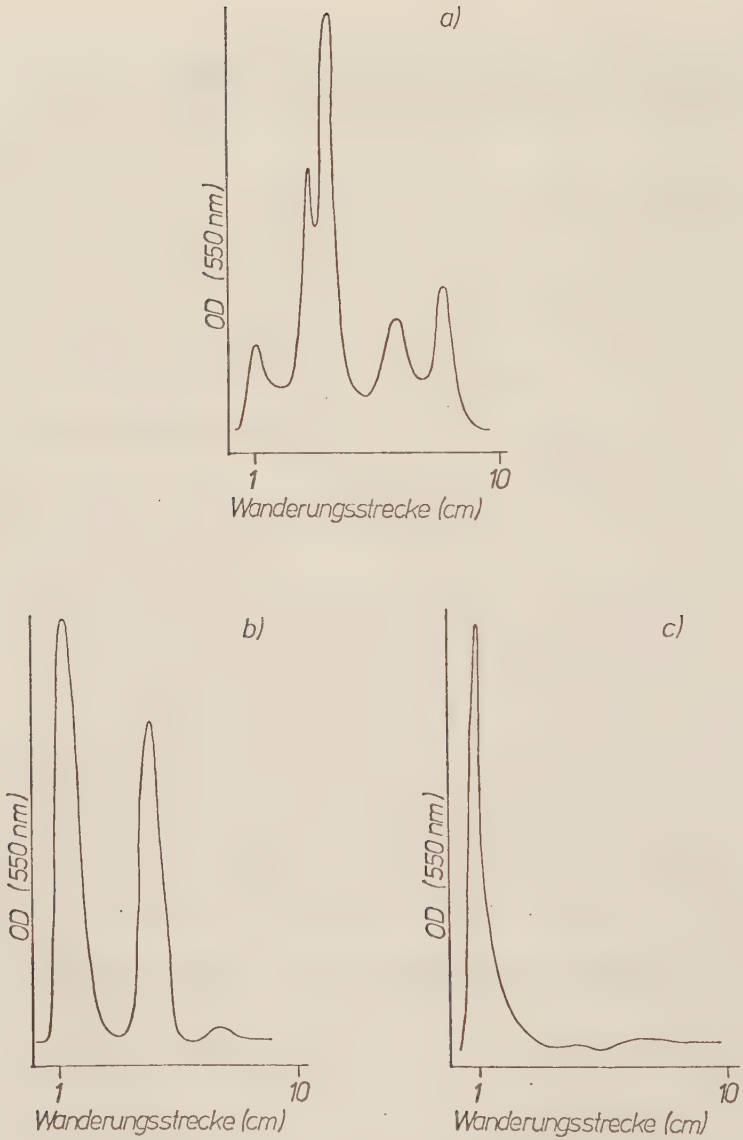


Abbildung 5: Densitometerdiagramme der durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Glykoproteine der a) CEA Präparationsstufe 3, b) CEA Präparationsstufe 4, c) CEA Präparationsstufe 5

c) Charakterisierung des CEA auf der Basis der Aminosäurenzusammensetzung

Spezifische Proteine bestehen aus einer innerhalb einer Spezies unveränderten typischen Aminosäurenzusammensetzung. Aminosäurenanalysen können daher als wichtiger Hinweis auf die chemische Reinheit eines Proteins gewertet werden. In der Tabelle 4 (Seite 2o) sind die Aminosäurenzusammensetzung des nach der 5 Stufenmethode präparierten CEA den CEA-Daten des National Institute for Biological Standards, England, gegenübergestellt. Das präparierte CEA weist gegenüber dem Referenz CEA nur unwesentliche Abweichungen im Bereich der Fehlermöglichkeit der Methode auf.

Glykoproteine, wie das CEA, bestehen aus einem Peptidanteil und einem Kohlenhydratanteil. Durch Massenbestimmung des Proteins bei gleichzeitigem Bestimmen des Peptidanteils durch die Aminosäurenanalyse war es möglich, den Kohlenhydratanteil des CEA zu berechnen. Mit Hilfe dieser kombinierten Methode wurde ein Kohlenhydratanteil von ca. 6o % ermittelt, was dem Wert der Literatur entspricht (29).

d) Immunologische Untersuchungen zur Charakterisierung des CEA

Seroimmunologische Untersuchungen mit der Methode der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony wurde zur Charakterisierung der serologischen Spezifität des CEA herangezogen. Diese Methodik erlaubt auch geringe Spuren von verunreinigenden Proteinen anhand der Spezifität immunologischer Präzipitationsreaktionen nachzuweisen. Hauptverunreinigung im CEA-Präparat ist üblicherweise NCA. Mit Hilfe von Anti-CEA-Seren (Präparationsstufe 4) wurde die biologisch-immunologische Spezifität des präparierten

Tabelle 4: Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung des nach dem verbesserten 5-Stufen-Verfahren präparierten CEA mit dem CEA des National Institute for Biological Standards, England.

Aminosäuren	CEA 1 (Mol/1ooMol)	CEA 2 (Mol/1ooMol)	Nat.Institute Standard (Mol/1ooMol)
Asp	14.4	14.1	14.8
Thr	1o.6	9.o	9.7
Ser	1o.4	9.7	1o.4
Glu	1o.1	1o.7	1o.9
Pro	9.4	7.7	8.7
Gly	5.5	5.6	5.5
Ala	6.9	6.7	6.3
Val	6.2	6.7	7.4
Cys/2	o.6	o.5	o.9
Met	-	-	o.1
Ile	4.3	5.o	4.3
Leu	8.4	9.o	7.7
Tyr	3.4	4.2	3.4
Phe	2.o	2.6	2.1
Lys	2.1	3.o	2.9
His	2.2	2.2	1.7
Arg	3.2	3.6	3.2

CEA überprüft. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, reagiert ein Anti-CEA-Serum,Präparationsstufe 4, mit CEA der Präparationsstufe 4 noch mit 2 getrennten Präzipitationslinien, während CEA der Präparationsstufe 5 nur noch eine Band ergibt. Eine radioimmunologische Studie mit Referenz CEA (Roche) beweist diese Bande als CEA (Abbildung 7).

Abbildung 6: Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony
1: 125-J-CEA (Roche)
2: CEA Präp.Stufe 4
3: CEA Präp.Stufe 5 und 125-J-CEA (Roche)
4: CEA Präp.Stufe 5
5: CEA Präp.Stufe 5
6: CEA Präp.Stufe 4
7: Anti-CEA-Serum der Präp.Stufe 4

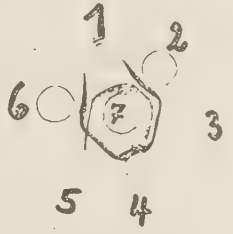
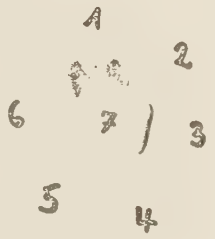


Abbildung 7: Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony
Gleiches Präparat wie in Abbildung 6, jedoch Wiedergabe der Autoradiographie. Die nach außen liegende Bande von 3 ist identisch mit der reinen CEA-Bande von 4 (Vergl.Abbildung 6)
1-7 wie in Abbildung 6



B. Modifikation des carcinoembryonalen Antigens

1.) Enzymatische Modifikation des CEA

Als enzymatische Modifikationsreaktion diente die Umsetzung des CEA mit Neuraminidase aus Cl. perfringens. Das Enzym Neuraminidase ist eine Glykosidase, die endständige Neuraminsäuren des Kohlenhydratanteils des CEA abspalten kann. CEA wurde mit 1oo mU Neuraminidase 3o Minuten in 5o mM Acetatpuffer pH 5,5 bei 37°C entsprechend den Bedingungen von Vasudevan et al. (48) zur Reaktion gebracht. Nach Ende der Reaktion wurde das CEA dann gegen phosphatgepufferter Saline pH 7,2 dialysiert und bis zur Immunisierung bei -2o°C aufbewahrt.

2.) Chemische Modifikationen des CEA

Die chemischen Modifikationsreaktionen können in 2 Gruppen eingeteilt werden. In der ersten Gruppe sind die einfachen Modifikationsreaktionen zusammengefasst. Hier reagieren Acetanhydrid und Laurylsäurechlorid, bevorzugt mit freien Aminogruppen, phenolischen Hydroxgruppen und Mercaptogruppen des Peptidanteils des CEA, Dimethylsulfat reagiert darüberhinaus noch mit freien Carboxylgruppen des Moleküls. In der zweiten Gruppe sind kombinierte Modifikationsreaktionen zu finden. Hierzu zählen die Einführung von Methylamingruppen in Carboxylgruppen des CEA mit Hilfe von Carbodiimid sowie Umsetzung des CEA mit Glutaraldehyd und die anschließende Methylamidierung nach der vorgenannten Methode.

Standardreaktionsbedingungen

Alle Reaktionen wurden in PBS durchgeführt. Die Konzentration des CEA in allen Modifikationsreaktionen betrug 1 mg/ml. Nach Abschluß der Modifikationsreaktion wurde das Reaktions-

gemisch in Viskingschläuche überführt und gegen PBS bei Raumtemperatur dialysiert.

Methylierung des CEA

Die Methylierung von Antigenen erwies sich in anderen Experimenten als besonders geeignet, die Immunogenität dieser Antigene zu erhöhen (42). Der Untersuchung der Methylierungsreaktion des CEA wurde deshalb besonderes Interesse gewidmet. Die Modifikationsreaktion des CEA mit dem elektrophilen Dimethylsulfat diente darüberhinaus für alle anderen nucleophilen Substitutionsreaktionen wie der Laurylierung und der Acetylierung als Modellreaktion zur Abschätzung der reaktiven Gruppen des Moleküls, da Dimethylsulfat von der Reaktionsfähigkeit her zwischen dem in dieser Reihe relativ trägen Laurylsäurechlorid und dem sehr reaktiven Acetanhydrid einzuordnen ist.

Spezielle Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung mit Dimethylsulfat

Die Reaktion des Dimethylsulfats erforderte besondere Reaktionsbedingungen, da die Umsetzung als Zweiphasenreaktion in wässrigem Milieu abläuft. Ein Zusatz von 5 % Äthanol zum Reaktionsansatz ermöglichte die Einphasenreaktion und damit eine effektivere Reaktion. Die Reaktionszeit wurde auf 2o Minuten, die Temperatur auf 37° C festgelegt. Diese Reaktionsbedingungen garantierten einen Umsatz von 8o% des zugesetzten Dimethylsulfats innerhalb der Reaktionszeit. Da bei der Reaktion Schwefelsäure entsteht, wurde die Umsetzung mit Hilfe eines Autotitrators kontrolliert und ein pH von 7,2 über die gesamte Reaktionszeit gehalten.

Funktionelle Gruppen des CEA, die methyliert werden können

Dimethylsulfat kann als elektrophiles Reagenz mit einer Reihe funktioneller Gruppen von Proteinen reagieren. So ist die Methylierung der phenolischen Hydroxygruppen, sowie der Mercaptogruppen des Cysteins und der ε-Aminogruppe des Lysins gesichert (42). Beim Lysin ist darüberhinaus noch mit Doppelmethylierung zu rechnen, da Methyllysin als starke Base um weiteres Dimethylsulfat konkurriert. Auch die Carboxylgruppen der Asparaginsäure und der Glutaminsäure sind unter diesen Reaktionsbedingungen methylierbar. Daneben kann die N-terminale Amino- und die C-terminale Carboxylgruppe durch Dimethylsulfat methyliert werden. Die freien Carboxylgruppen der Neuraminsäuren des Kohlenhydratanteils des CEA sind bei den Reaktionsbedingungen auch der Umsetzung mit Dimethylsulfat zugänglich. Dagegen reagieren die alkoholischen Hydroxygruppen des Threonins und des Serins sowie die Hydroxygruppen des Kohlenhydratanteils unter den gewählten Bedingungen nicht mit dem Dimethylsulfat.

Umsetzung des CEA mit radioaktivem 14-C-Dimethylsulfat

Die Methylierung des CEA mit radioaktivem 14-C-Dimethylsulfat erlaubte die Abschätzung der Anzahl der in das Molekül eingeführten Methylgruppen. Die Sättigungskurve der Methylierungsreaktion wurde mit steigenden Mengen an Dimethylsulfat erstellt. Das Glykoprotein wurde dabei mit dem 600-, 3000-, 12000-, 47000- und 120000-fachen molaren Überschuß an Methylierungsreagenz zur Reaktion gebracht und nach extensiver Dialyse die im Molekül gebundene Radioaktivität bestimmt. In Abbildung 8 ist die erhaltene Sättigungskurve der Methylierung mit Dimethylsulfat wiedergegeben. Wie man aus der Sättigungskurve der Methylierungsreaktion sehen kann,

wurden nicht alle reaktionsfähigen Gruppen bei der gewählten höchsten Konzentration an Dimethylsulfat umgesetzt. Nach Extrapolation der Kurve auf 1oo%ige Sättigung läßt sich die Methylierungsquote des CEA bei 12oooofachen molaren Überschuß an Dimethylsulfat auf 7o-8o % bestimmen. Diese Daten entsprechen den theoretischen Erwartungen weitgehendst.

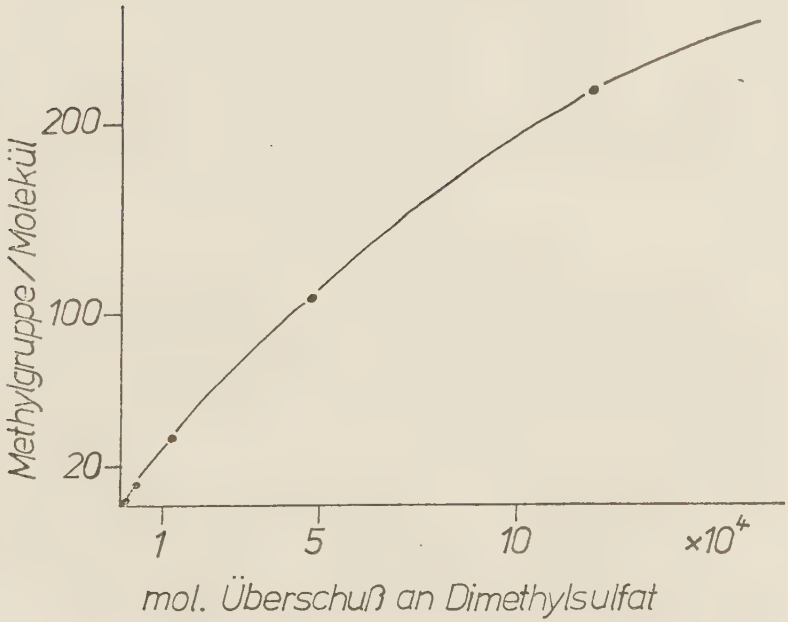


Abbildung 8 : Sättigungskurve der Methylierungsreaktion des CEA mit 14-C-Dimethylsulfat

Die Anzahl der in das CEA-Molekül eingeführten Methylgruppen ist in Abhängigkeit vom molaren Überschuß an Dimethylsulfat in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Relation der an CEA kovalent gebundenen Methylgruppen zum molaren Überschuß an Dimethylsulfat

Molarer Überschuß an Dimethylsulfat	Kovalent gebundene Methylgruppen
600	2,3
3000	10,2
12000	34,8
47000	107,9
120000	217,0

Bei einem Kohlehydratanteil des CEA von 60% fallen auf den Peptidanteil des Moleküls ca. 800 Aminosäuren. Unter Berücksichtigung der Häufigkeit der entsprechenden Aminosäuren im CEA-Präparat errechnen sich für den Peptidteil im CEA 257 reaktive Gruppen (Asp, Glu, Tyr, Lys). Bei Annahme einer dem CEA des National Institute of Standards ähnlichen Zusammensetzung des Kohlehydratanteils erhält man einen Neuraminsäuregehalt von 3% und es errechnen sich weitere 25 Zuckercarboxylgruppen, die durch Dimethylsulfat methyliert werden können. Die Aminogruppen der Aminozucker des CEA sind acetyliert und reagieren deshalb nicht mit dem Methylierungsmittel. Nach dieser Abschätzung weist das CEA etwa 282 methylierbare Gruppen auf. Die auf Grund der spezifischen Aktivität berechneten

217 methylierten Gruppen bei 7o - 8o%iger Sättigung (siehe Sättigungskurve) stehen in guter Übereinstimmung mit dem theoretisch berechneten Wert von 77%.

Stabilität der kovalent gebundenen Methylgruppen unter physiologischen Bedingungen

Neben den unter physiologischen Bedingungen chemisch relativ stabilen Bindungen der Methylgruppen mit den phenolischen Hydroxy- und den Aminogruppen werden auch leicht hydrolysierbare Bindungen mit Carboxylgruppen gebildet. Es war daher wichtig, den Prozentsatz der stabil gebundenen Methylgruppen zu bestimmen, da mit einer Hydrolyse der Methyl-Esterbindungen durchaus unter physiologischen Bedingungen zu rechnen ist. Unter Hydrolysebedingungen wurden etwa 51 % der Methylgruppen verseift. Die Abbildung 9 a zeigt die Hydrolysekurve des methylierten CEA bei pH 8.o.
Zur Bestimmung des Anteils der alkalilabilen Methylgruppen des CEA-Moleküls wurde das Präparat bei 37° C in o.1 N Natronlauge 12 Stunden inkubiert und die verbleibende Radioaktivität bestimmt (Abbildung 9 b). Unter diesen verschärften Bedingungen wurden beim höchstmethylierten Präparat 62% der gebundenen Methylgruppen hydrolysiert. In der Tabelle 6 sind die nach Inkubation bei pH 8.o bzw. o.1 N Natronlauge und anschließender extensiver Dialyse stabil gebundenen Methylgruppen den ursprünglich eingeführten Methylgruppen gegenüber gestellt.

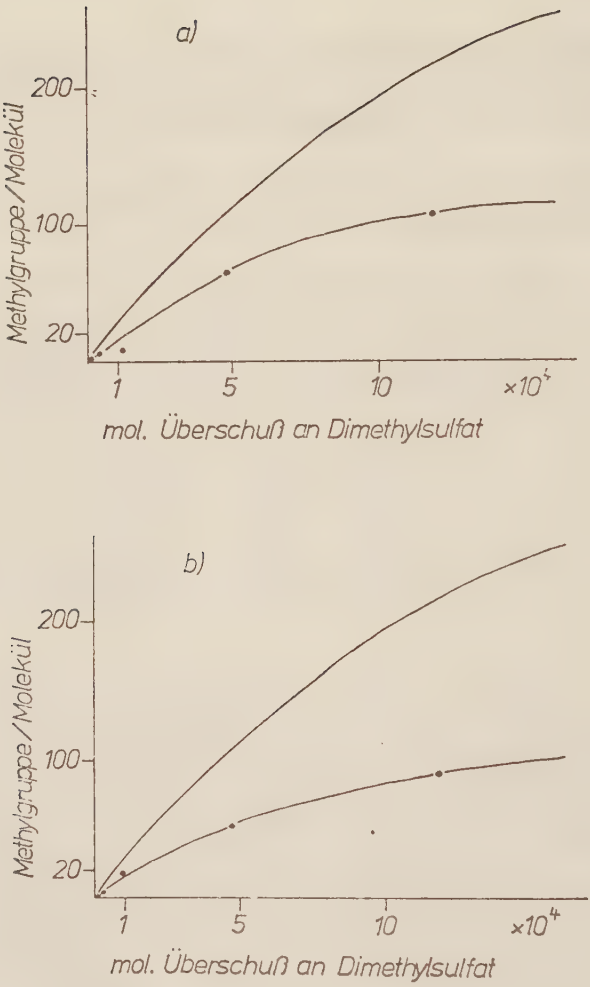


Abbildung 9 : Hydrolysekurven des methylierten CEA
a) nach 12 Stunden bei pH 8,o
b) nach 12 Stunden in o,1 N Natronlauge
Zum Vergleich ist die Sättigungskurve der Methylierungsreaktion eingezeichnet

Tabelle 6 : Bestimmung der hydrolyseempfindlichen Methylgruppen des methylierten CEA nach 12-stündiger Inkubation bei 37° C, pH 8.o und in o.1 N NaOH

CEA-Präparat	Kovalent gebundene Methylgruppen	Kovalent gebundene Methylgruppen nach Hydrolyse	
		bei pH 8.o	o.1 N NaOH
CEA 6oo M	2.3	1.8	1.4
CEA 3ooo M	1o.2	6.7	6.o2
CEA 12ooo M	34.8	8.o	19.1
CEA 47ooo M	1o7.9	66.1	51.8
CEA 12oooo M	217.o	1o9.o	9o.9

Serologische Kreuzreaktion der methylierten CEA Präparate mit Anti- CEA $_{nativ}$ Serum von der Ziege

Die Einführung von chemisch definierten Gruppen in das Antigen oder das Abspalten von ursprünglich vorhandenen Molekülgruppen, beispielsweise von Zuckerresten aus dem Antigen kann zu Strukturänderungen des Antigens führen. Modifizierte Antigenpräparate weisen daher gegenüber dem jeweiligen Anti-CEA$_{nativ}$Serum häufig unterschiedliche immunologische Kreuzreaktivität auf. Besonders die konformationsspezifischen Antikörper sind dann nicht mehr in der Lage, mit den entsprechenden immunologischen Determinanten des Antigens zu reagieren, da die Modifikation zu neuen Konformationen im Bereich der immunologischen Determinanten geführt hat.
Das Ausmaß der Kreuzreaktion der methylierten CEA-

Präparate mit Anti-CEA_{nativ}-Seren wurde in einem Inhibitions-Radioimmuntest bestimmt (22), und das Ergebnis dem entsprechenden Methylierungsgrad des CEA gegenübergestellt. Das Resultat dieser Untersuchung ist in der Kurve der Abbildung 1o wiedergegeben. Ein Methylierungsgrad von 7o - 8o% wie im CEA 12oooo M zeigt dabei weniger als15% Kreuzreaktivität Anti-CEA_{nativ}Serum. Dieser Befund bedeutet, daß bevor alle reaktionsfähigen Gruppen des CEA methyliert wurden, weitgehende strukturelle Änderungen des Antigen induziert wurden, die die Kreuzreaktivität des methylierten Präparats mit dem Anti-CEA_{nativ} Serum stark herabsetzen.

Chemisch oder enzymatisch modifizierte CEA-Präparate für die immunologischen Untersuchungen

a) Methyliertes CEA: "CEA-6oo-M", "CEA-5oooo-M"

CEA des Methylierungsgrades 6oo-M und 5oooo-M wurde zur Immunisierung der Mäuse herangezogen.

b) Acetyliertes CEA: " CEA-6oo-Ac"

Ein acetyliertes CEA-Präparat das durch Umsetzung mit dem 6oo-fachen molaren Überschuß an Acetanhydrid (CEA-6oo-Ac) gewonnen wurde, diente zur Immunisierung der Tiere.

c) Lauryliertes CEA: " CEA-6oo-Lau"

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte mit einem CEA-Präparat, das mit 6oo-fachem molarem Überschuß an Laurylsäurechlorid umgesetzt worden war.

d) Methylamidiertes CEA: "CEA-MA-1oo/5oco"

Die Methylamidierung des CEA erfolgte nach Aktivierung

mit einem Carbodiimid und anschließender Umsetzung mit Methylamin in 5ooo-fachem molarem Überschuß unter Standardreaktionsbedingungen.

e) Glutardialdehydfixiertes und methylamidiertes CEA: " CEA-GMA-35"

Die Immunisierung erfolgte mit einem CEA-Präparat, das bei 35ooo-fachem molarem Überschuß an Glutardialdehyd und anschließender Methylamidierung gewonnen wurde.

f) Neuraminidasebehandeltes CEA: " CEA-Neu"

Die Tiere wurden mit einem CEA-Präparat, das mit 1oo mU Neuraminidase behandelt wurde, immunisiert.

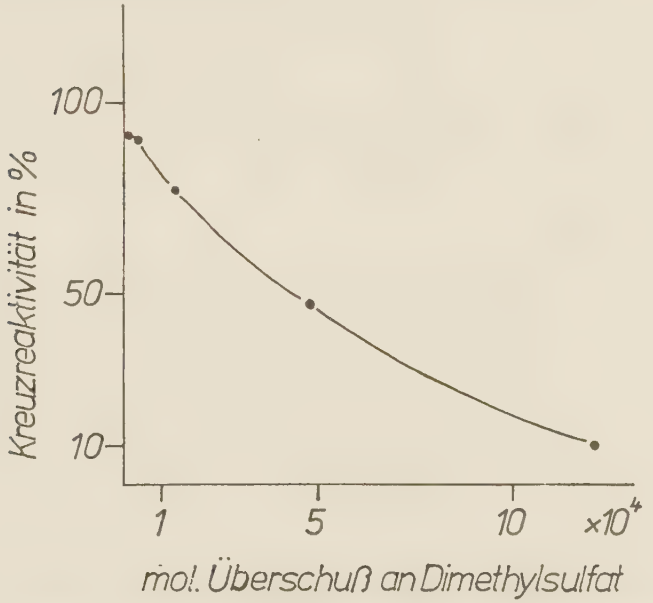


Abbildung 1o: Kreuzreaktion von verschieden stark methyliertem CEA mit Anti-CEA_{nativ}Serum

C. Immunogenität des nativen und der modifizierten CEA-Präparate in Mäusen

Die immunologischen Untersuchungen zielten darauf ab, die immunogene Kapazität der modifizierten CEA-Präparate in Mäusen bezüglich zellulärer Immunreaktion zu überprüfen. Die Quantifizierung der humoralen Immunantwort gegenüber nativem CEA ermöglichte es, geeignete Präparate zu ermitteln, die eine selektive Induktion zellulärer Immunreaktion bei möglichst niedriger humoraler Immunantwort erzeugen.
Die immunologischen Experimente zur Messung der Immunogenität der verschiedenen CEA-Präparate können unterteilt werden in in vivo und in in vitro Untersuchungen. Bei der gewählten in vivo Methode der Fußsohlenschwellungsmessung konnte sowohl die Sofortreaktion, als auch die verzögerte Immunreaktion gemessen werden. Bei der in vitro Methode wurden die humoralen Antikörper gemessen, die gegen die jeweiligen CEA-Präparate gebildet wurden.

In vivo Experimente

Die Erfassung der immunologischen Sofortreaktion (Arthusreaktion) kann als in vivo Methode zum Nachweis von Antikörpern angesehen werden. Eine Arthusreaktion kommt durch Verbleiben des Antigens am Ort der Injektion bei Anwesenheit spezifisicher Antikörper zustande. Als typische Folgen der Antigen-Antikörperreaktion werden Entzündungsmediatoren freigesetzt. Dies führt zu lokaler Entzündung, zur örtlichen Temperaturerhöhung und zur Ödembildung. Als Maßsystem für diesen Vorgang diente der Fußsohlenschwelltest immunisierter Mäuse nach intradermaler Injektion des Antigens in die Fußsohle der Tiere. Die Schwellung der Pfoten erreichte 3 Stunden nach Injektion des Antigens ihr erstes Maximum und wird allgemein als Ausdruck der

Arthusreaktion gewertet (4o). Eine Schwellung der Fußsohlen nach 24 Stunden, d.h. ein zweites Schwellungsmaximum, das nach Rückgang der Arthusreaktion auf Kontrollwerte auftritt, eignet sich als Maß für eine zelluläre Immunreaktion (4o). Diese Immunreaktion vom verzögerten Typ (Spättyp) ist ebenfalls an lokalem Verbleiben des Antigens im Gewebe gebunden und auf Einwanderung von Lymphozyten zurückzuführen.
Der Grad der Fußsohlenschwellung ist also zur Messung humoraler und zellulärer Immunphänomene geeignet und kann daher für die in vivo Beurteilung der Immunogenität modifizierter CEA-Präparate im Vergleich zum nativen CEA herangezogen werden.

Die Tierexperimente sind ihrer Anordnung nach in 2 Hauptserien (1.,2.) unterteilt. In der einen Versuchsreihe wurden die Tiere mit verschiedenen modifizierten CEA Präparaten primär immunisiert und die Immunantwort auf intradermale Applikation des nativen Antigens nach 14 Tagen mit Hilfe des Fußsohlenschwelltests gemessen. In der anderen Versuchsserie wurden bei der intradermalen Zweitinjektion die Immunantwort gegen das homologe CEA gemessen. Darüberhinaus wurden einige Untersuchungen angestellt, die es erlaubten, den Effekt von Mehrfachimmunisierungen zur Induktion zellulärer Immunphänomene zu beurteilen. Als Kontrollgruppen zu allen Experimenten dienten jeweils Tiere, denen statt der modifizierten CEA Präparate natives CEA injiziert wurde. In der ersten Versuchsserie wurde die Primärimmunisierung mit unterschiedlichen Mengen der verschiedenen CEA Präparate durchgeführt, so daß die Dosisabhängigkeit der erzielten Effekte ableitbar war.

Die Abhängigkeit der Immunogenität des CEA vom Methylierungsgrad sowie die Bedeutung labiler Methylgruppen bei der Induktion zellulärer Immunreaktionen wurde gesondert geprüft. Zu diesen Untersuchungen fand CEA-50000-M Verwendung, bei dem durch gezielte Hydrolyse die labilen Methylgruppen abgespalten worden waren. Alle Tiere wurden mit Ausnahme bei Mehrfachimmunisierungen nach einem einheitlichen Immunisierschema behandelt.

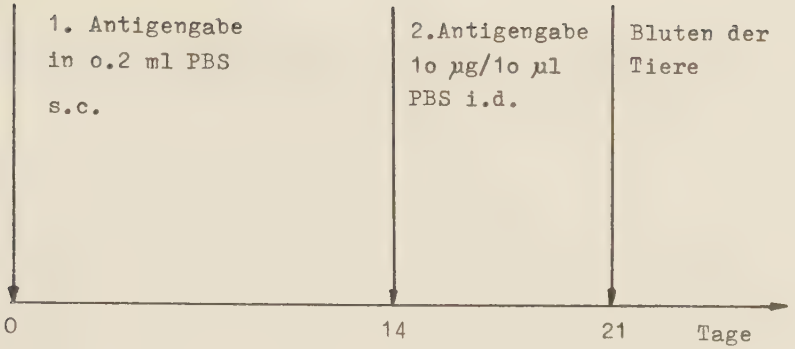


Abbildung 11: Immunisierschema für die STU-Mäuse mit verschiedenen CEA-Präparaten

Am Tage o erhielten die Mäuse die 1. Antigengabe subcutan in die Flanke. Die Dosis des modifizierten bzw. des nativen CEA betrug dabei o, o.2, 2o und 5oo ng und war in o,2 ml PBS gelöst. Am 14. Tag wurde den Tieren in den medialen Teil der Planta pedis der rechten Hinterpfote intradermal 1o µg des jeweiligen Antigens injiziert, während in die linke Pfote Saline injiziert wurde. Die Pfotendicke der rechten und linken Hinterpfote wurde nach 3, 7, 24, 48 und teilweise nach 72 h mit dem Schnelltaster A o2T der Firma Kröplin ermittelt und die Differenz der Pfotendicke als Schwellparameter gegen die Zeit aufgetragen. Sieben Tage nach intradermaler Zweitinjektion des Antigens wurden die Mäuse einzelner Gruppen geblutet und das Serum auf Antikörper gegen natives CEA untersucht.

1.) In vivo Immunreaktion nach intradermaler Zweitinjektion von nativem CEA

a.) Immunisierung mit o.2 ng Antigen

In der Tabelle 7 und in der Abbildung 12 (Seite 38) sind die Ergebnisse des Pfotenschwelltestes nach Primärimmunisation der Mäuse mit einer Dosis von o.2 ng der verschiedenen CEA-Präparate und intradermaler Zweitinjektion von 1o µg nativem CEA wiedergegeben. Die Pfotenschwellung ist in 1/1oo mm angegeben. Wie man sieht erzeugt die Immunisierung der Tiere mit acetyliertem CEA-6oo-Ac die höchste Arthusreaktion in diesem Dosisbereich und übertrifft damit auch die Kontrollgruppe. Immunisierung der Tiere mit CEA- GMA-35 dagegen führt zur niedrigsten Arthusreaktion. Eine eindeutige Pfotenschwellung nach 24 h als Maß für zelluläre Immunreaktionen war bei den Mäusen festzustellen, die CEA-6oo-M als Erstinjektion erhielten, diese betrug ca. 7o% der Schwellung der Arthusreaktion. Kontrolltiere zeigten überhaupt keine meßbare verzögerte Immunreaktion. In den anderen Gruppen war die Arthusreaktion gegenüber der Kontrollgruppe vermindert, zelluläre Immunreaktionen waren dagegen nur wenig ausgeprägt oder konnten wie im Falle der Immunisierung mit CEA-Neu und CEA-6oo-Lau schlecht abgegrenzt werden, da eine über 3 Stunden hinaus anhaltende Arthusreaktion auftrat und bei 7 Stunden kein eindeutiges Minimum erkennbar war.
Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe deuten darauf hin, daß CEA-6oo-M insbesondere gegenüber dem nativen, aber auch gegenüber den anderen CEA Präparaten eine verstärkte Immunogenität zur Induktion zellulärer Immunreaktion aufweist bei gleichzeitig reduzierter antikörperbedingter Sofortreaktion.

Tabelle 7 : Pfotenschwellung nach Erstinjektion von o.2 ng verschiedener CEA Präparate und intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA

Präparat	Pfotenschwellung[+] nach 3	7	24	48 Stunden
CEA nativ[§]	2o	2	o	o
CEA-6oo-M	15	6	1o	11
CEA-MA-1oo/5ooo	15	2	2	4
CEA-6oo-Ac	3o	2	4	6
CEA-6oo-Lau	16	6	6	2
CEA-GMA-35	8	2	3	2
CEA-Neu	18	1o	8	7

+ : angegeben in 1/1oo mm

§ : Kontrollgruppe

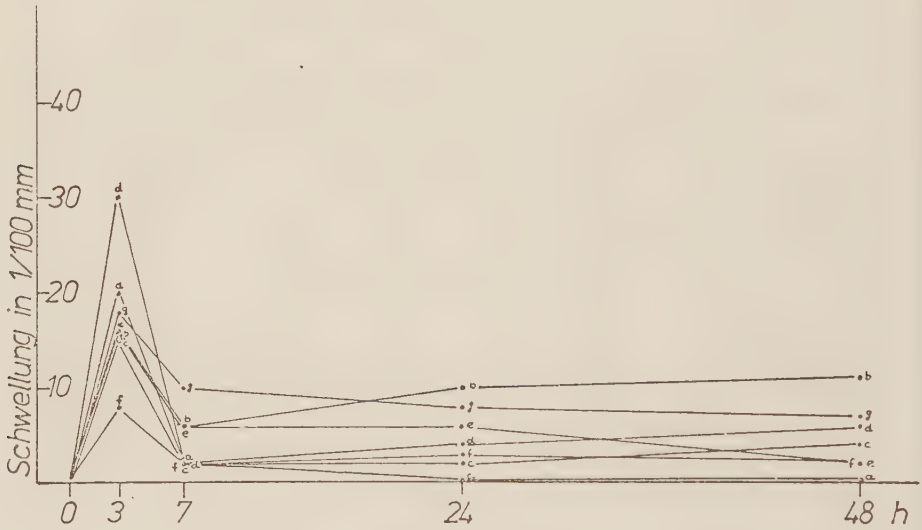


Abbildung 12: Verlauf der Pfotenschwellung während 48 Stunden nach intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA, 14 Tage nach Erstimmunisierung mit o.2 ng verschiedener CEA-Präparate. Erstimmunisation mit a) CEA nativ, b) CEA-6oo-M, c) CEA-MA-1oo/5ooo, d) CEA-6oo-Ac, e) CEA-6ooo-Lau, f) CEA-GMA-35, g)CEA-Neu

b.) Immunisierung mit 2o ng Antigen

Die eindeutig höchste Arthusreaktion in dieser Versuchreihe wurde in der Kontrollgruppe nach intradermaler Zweitinjektion von nativem homologem CEA erzielt. Bei heterologer Zweitinjektion von nativem CEA in Mäusen, die mit CEA-Neu oder CEA-6oo-M erstimmunisiert worden waren, trat eine auf ca. 8o% der Kontrollgruppe reduzierte Arthusreaktion auf, Tiere der mit den anderen modifizierten CEA-Präparaten immunisierten Gruppen zeigten eine noch weiter verminderte Arthusreaktion, wobei auch bei dieser Antigendosis die absolut niedrigste Pfotenschwellung nach 3 Stunden bei den Tieren gemessen wurden, die CEA-GMA-35 bei der Erstimmunisierung erhielten. Mäuse die mit nativem CEA (Kontrollgruppe), CEA-Neu und CEA-GMA-35 immunisiert worden waren, zeigten keine verzögerte Immunreaktion im Pfotenschwelltest, bei Tieren der Gruppe CEA-6oo-M dagegen war eine deutliche zelluläre Immunreaktion gegen das native CEA meßbar, die 48 h nach intradermaler Injektion des Antigens noch unverändert nachweisbar war. Der Fußsohlenschwelltest erreichte in dieser Gruppe nach 24 h ein erneutes Maximum und betrug etwa 45% der Schwellung der Arthusreaktion. Dieses Maximum stellte den höchst gemessenen Wert für verzögerte Immunreaktionen innerhalb dieser Gruppe dar. Dieses Ergebnis wurde auch in der Gruppe CEA-6oo-Ac erzielt, die Schwellung betrug jedoch nur ca. 3o% der Arthusreaktion. Auch in den Gruppen,die CEA-6oo-Lau und CEA-MA -1oo/5ooo als erste Antigengabe erhielten, waren zelluläre Immunreaktionen nachweisbar, die Stärke dieser verzögerten Immunreaktionen war jedoch nach 48 h deutlich abgeflacht. Die Tabelle 8 und die Abbildung 13 (Seite 41)zeigen die Ergebnisse des Pfotenschwelltests nach Immunisierung der Tiere mit Dosen von 2o ng Antigen.

Tabelle 8 : Pfotenschwellung nach Erstinjektion von 2o ng verschiedener CEA Präparate und intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA

Präparat	Pfotenschwellung+ nach 3	7	24	48 Stunden
CEA nativ§	36	4	o	2
CEA-6oo-M	3o	o	13	13
CEA-MA-1oo/5ooo	2o	2	11	7
CEA-6oo-Ac	22	o	6	7
CEA-6oo-Lau	2o	2	16	4
CEA-GMA-35	16	3	8	5
CEA-Neu	31	7	7	7

+ : angegeben in 1/1oo mm

§ : Kontrollgruppe

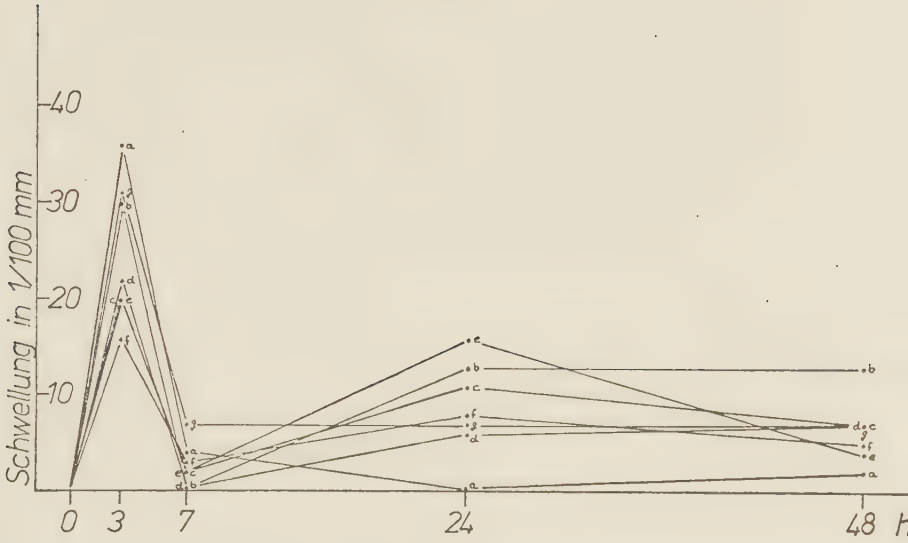


Abbildung 13: Verlauf der Pfotenschwellung während 48 Stunden nach intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA, 14 Tage nach Erstimmunisierung mit 2o ng verschiedener CEA-Präparate. Erstimmunisation mit a) CEA nativ, b) CEA-6oo-M, c) CEA-MA-1oo/5ooo, d) CEA-6oo-Ac, e)CEA-6oo-Lau, f) CEA-GMA-35, g) CEA-Neu

In der Versuchsserie mit 2o ng Antigen Erstimmunisierung bestätigte sich das Ergebnis der vorausgehenden Serie mit o.2 ng Antigen. Auch hier zeigte CEA-6oo-M die höchste Fußsohlenschwellung zwischen 24 und 48 h bei reduzierter Arthusreaktion. Tiere, die mit CEA-6oo-Ac oder CEA-6oo-Lau immunisiert worden waren, wiesen jedoch auch eine meßbar verzögerte Immunreaktion auf. Die Methylierung des CEA zeigte sich auch hier als besonders geeignet, die Immunogenität des CEA im Hinblick auf verzögerte Immunreaktionen zu verstärken.

c.) Immunisierung mit 5oo ng Antigen

Die höchste Arthusreaktion wurde wie bei der vorausgehenden Serie bei den Kontrolltieren gemessen, die mit homologem nativem CEA zweitimmunisiert worden waren. In dieser Gruppe war ebenso wie in allen Kontrollgruppen zuvor keine verzögerte Immunreaktion im Schwellungstest nachweisbar. Mäuse, die mit CEA-6oo-Lau und mit CEA-6oo-M immunisiert worden waren, zeigten nach intradermaler Zweitimmunisierung noch 75-9o% der Arthusreaktion der Kontrollgruppe, jedoch konnte man bei diesen Gruppen eine verzögerte Immunreaktion nachweisen, die bei der CEA-6oo-M Gruppe über 48 Stunden nachweisbar war. Eine derartige langanhaltende Fußsohlenschwellung fand sich bei dieser Versuchsreihe nur noch in der Gruppe, die mit CEA-6oo-Ac immunisiert worden war. In dieser Gruppe wurde zusammen mit der Gruppe, die mit CEA-GMA-35 behandelt worden war, die geringste Arthusreaktion mit 18/1oo mm gemessen. Tiere, die mit CEA-MA-1oo/5ooo oder mit CEA-Neu immunisiert worden waren, wiesen zwar auch eine geringfügige Schwellung 24 h nach intradermaler Zweitimmunisierung auf, jedoch lag diese deutlich niedriger als in den anderen Gruppen. In der Tabelle 9 und in der Abbildung 14 (Seite 45)sind alle Ergebnisse dieser Gruppen verzeichnet.

Tabelle 9 : Pfotenschwellung nach Erstinjektion von 5oo ng verschiedener CEA Präparate und nach intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA

Präparat	Pfotenschwellung[+] nach 3	7	24	48 Stunden
CEA nativ[§]	42	6	3	2
CEA-6oo-M	3o	3	9	12
CEA-MA-1oo/5ooo	19	2	9	2
CEA-6oo-Ac	18	o	12	9
CEA-6oo-Lau	38	2	16	6
CEA-GMA-35	18	2	7	6
CEA-Neu	23	2	5	5

+ : angegeben in 1/1oo mm

§ : Kontrollgruppe

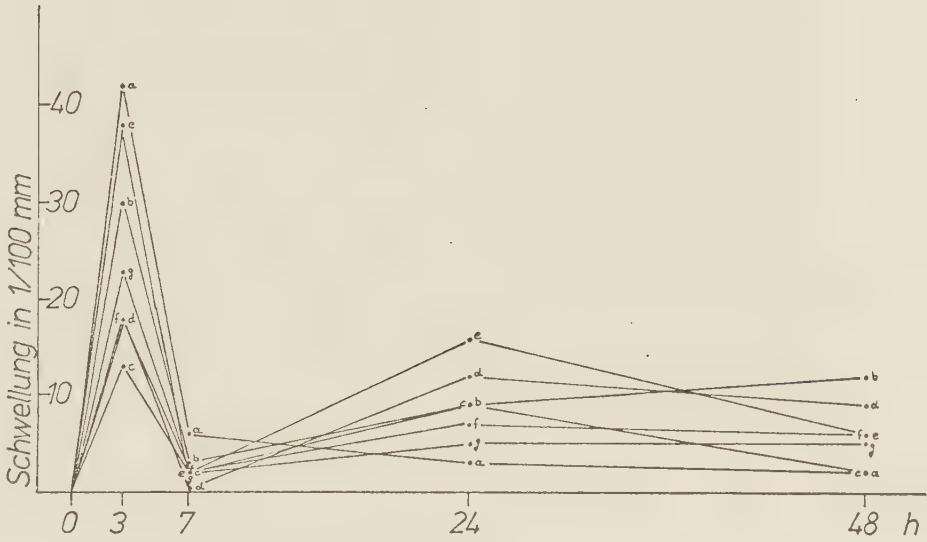


Abbildung 14 : Verlauf der Pfotenschwellung während 48 Stunden nach intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA, 14 Tage nach Erstimmunisierung mit 5oo ng verschiedener CEA-Präparate. Erstimmunisation mit a) CEA nativ, b) CEA-6oo-M, c) CEA-MA 1oo/5ooo, d) CEA-6oo-Ac, e) CEA-6oo-Lau, f) CEA-GMA-35, g) CEA-Neu

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Immunisierung der Tiere mit nativem CEA führte im allgemeinen zur höchsten Arthusreaktion, die sicherlich rückführbar ist auf die Zweitinjektion mit dem homologen nativen CEA. Die Induktion zellulärer Immunreaktion durch Immunisation mit chemisch modifiziertem CEA bei gleichzeitig reduzierter Arthusreaktion wurde besonders durch Erstimmunisation mit CEA-600-M und CEA-600-Ac erreicht. Die Immunogenität des CEA konnte hier durch chemische Modifikation selektiv manipuliert werden und zugunsten verzögerter Immunreaktion verschoben werden. Eine Dosisabhängigkeit des Effektes ist gegeben, da einerseits die Absolutschwellung mit Dosiserhöhung zunahm und andererseits, wenn auch in geringem Maße, die Immunisierung mit höheren Dosen anderer Modifikationen des CEA wie CEA-MA-100/5000 und CEA-GMA-35 sowie CEA-Neu zu messbaren verzögerten Immunreaktionen führte.

2.) In vivo Immunreaktion nach intradermaler Zweitinjektion von modifiziertem CEA

In dieser Versuchsserie, bei der die Immunreaktion nach homologer Zweitinjektion der modifizierten CEA-Präparate gemessen wurde , sind neben den methylierten Antigenen CEA-6oo-M auch CEA-Neu und CEA-MA-1oo/5ooo getestet worden. Alle Tiere erhielten zur Erstimmunisierung 5oo ng des jeweiligen Antigens s.c. und als Zweitimmunisierung 1o µg/1oµl desselben Antigens i.d. Die Arthusreaktion war insgesamt niedriger als in den vorangehenden Experimenten. Eine deutlich verzögerte Immunreaktion dagegen war bei den Gruppen zu vermerken, die mit CEA-6oo-M und CEA-MA-1oo/5ooo behandelt worden waren, gemessen worden. Mäuse der Kontrollgruppe, die bei Erstimmunisierung natives CEA und bei der Zweitinjektion ein methyliertes CEA Präparat (CEA-6oo-M) injiziert erhielten, zeigten ebenfalls eine,wenn auch geringer ausgeprägte, verzögerte Immunreaktion, die aber nach 48 h erst ihr Maximum erreicht hatte.
In Tabelle 1o und in Abbildung 15 (S.49) sind die Ergebnisse dieser Versuchsserie wiedergegeben.

Tabelle 1o: Pfotenschwellung nach Erstinjektion von 5oo ng verschiedener CEA Präparate und intradermaler Injektion von 1o µg homologem CEA

Präparat	Pfotenschwellung[+] nach 3	7	24	48 Stunden
CEA nativ[§]	18	6	7	9
CEA-6oo-M	2o	4	7	7
CEA-MA-1oo/5ooo	26	6	1o	9
CEA-Neu	17	4	5	5

+: angegeben in 1/1oo mm

§: Zweitinjektion mit 1o µg CEA-6oo-M, Kontrollgruppe

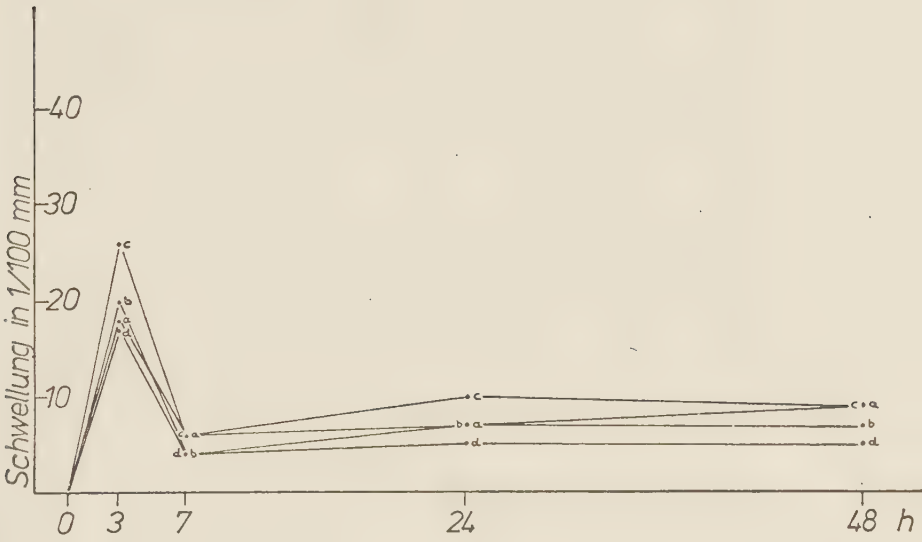


Abbildung 15 : Verlauf der Pfotenschwellung während 48 Stunden nach intradermaler Injektion von 1o µg homologem CEA, 14 Tage nach Erstimmunisierung mit 5oo ng verschiedener CEA-Präparate. Erstimmunisierung mit a) CEA nativ§ b) CEA-6oo-M, c) CEA-MA-1oo/5ooo, d) CEA-Neu.

§: Zweitinjektion mit 1o µg CEA-6oo-M

3.) Einfluß der Mehrfachimmunisierung auf die in vivo Immunreaktion

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß von Mehrfachimmunisierung auf die Erzeugung von verzögerten Immunreaktionen untersucht. Die Serie bestand aus 4 Tiergruppen. Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit 5oo ng nativem CEA immunisiert, nach 14 Tagen erfolgte eine weitere Injektion mit 5oo ng s.c. des Antigens und nach weiteren 14 Tagen wurde dann 1o µg natives CEA i.d. in die Fußsohle injiziert. Tiere der anderen Gruppen wurden ebenso behandelt, nur wurde zur Erstinjektion 5oo ng CEA-6oo-M bzw. CEA-MA-1oo/5ooo verwendet. Eine 4. Gruppe wurde auch zur Zweitimmunisierung mit dem modifizierten CEA-6oo-M injiziert und erst die dritte Immunisierung wurde mit 1o µg nativem CEA intradermal durchgeführt. Das nachfolgende Immunisierschema gibt einen Überblick über die Mehrfachimmunisierung.

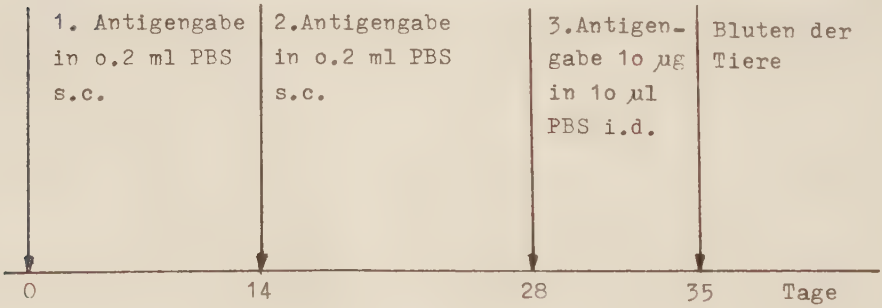


Abbildung 16: Mehrfachimmunisierschema für STU-Mäuse

Die Kontrollgruppe zeigte eine ausgeprägte Arthusreaktion, die Schwellung hielt lang an und ging nur zögernd zurück. Die Arthusreaktion der Kontrollgruppe war bei 3maliger

Immunisierung nicht höher als bei 2maliger Immunisierung. Die Arthusreaktion der anderen Versuchsgruppen war niedriger, eine verzögerte Immunreaktion war jedoch bis zu 24 h nachweisbar. Diese zelluläre Immunreaktion konnte nur schwer gegenüber der länger anhaltenden Arthusreaktion abgegrenzt werden. Die Mäuse der Gruppe, die mit CEA-6oo-M zweimalig immunisiert worden waren, zeigten über 48 Stunden eine verzögerte Immunreaktion. Die Abbildung 17 und die Tabelle 11 zeigen die Ergebnisse dieser Serie(Abbildung 17, Seite 52).

Tabelle 11: Pfotenschwellung nach zweimaliger Injektion mit 5oo ng verschiedener CEA Präparate und einer intradermalen Injektion von 1o µg nativem CEA

Präparate	Pfotenschwellung+ nach 3	7	24	48 Stunden
CEA nativ&	4o	21	11	4
CEA-6oo-M	24	7	1o	6
CEA-MA-1oo/5ooo	35	3	8	6
CEA-6oo-M§	25	6	9	9

+ : angegeben in 1/1oo mm

§ : 2malige Immunisierung mit CEA-6oo-M

& : Kontrollgruppe

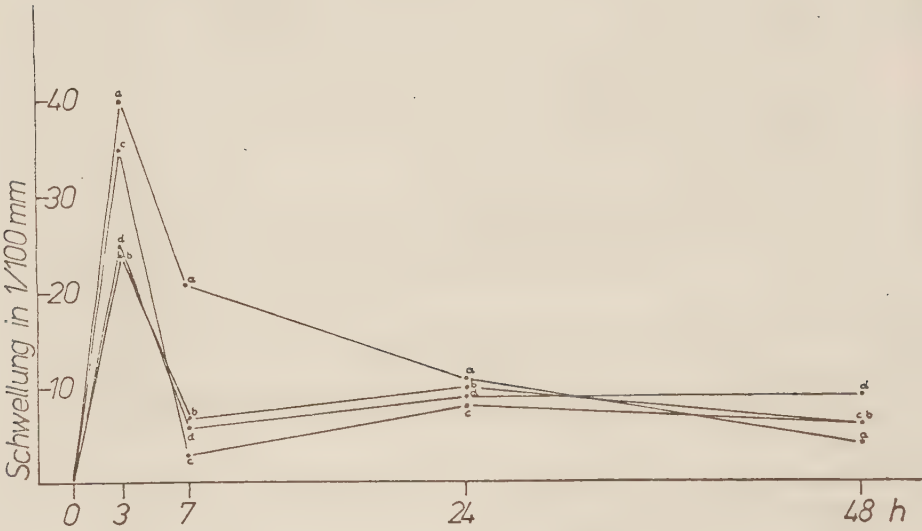


Abbildung 17: Verlauf der Pfotenschwellung während 48 Stunden nach intradermaler Injektion von 10 µg nativem CEA, nach zweimaliger Vorimmunisierung mit 500 ng verschiedener CEA-Präparate. Erstimmunisierung mit a) CEA nativ, b) CEA-600-M, c) CEA-MA-100/5000, d) CEA-600-M§

§ : Zweimalige Immunisierung mit CEA-600-M

4.) Abhängigkeit der zellulären Immunreaktion vom Grad der Modifikation des CEA

Die Induktion zellulärer Immunreaktionen in Abhängigkeit vom Grad der chemischen Modifikation wurde mit methyliertem CEA getestet. CEA-5oooo-M weist 5o mal mehr gebundene Methylgruppen pro Molekül auf, als das bisher verwendete CEA-6oo-M.
In dieser Untersuchung wurden neben dem CEA-5oooo-M auch CEA Präparate nach partieller Hydrolyse der labilen Methylgruppen und nach totaler Hydrolyse in o.1 N NaOH zur Immunisierung der Mäuse verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 und in der Abbildung 18 wiedergegeben.

Tabelle 12: Pfotenschwellung nach Erstimmunisierung mit 5oo ng verschieden behandelten CEA-5oooo-M Präparaten und intradermaler Zweitinjektion von 1o µg nativem CEA

	Pfotenschwellung+ nach				
Präparat	3	7	24	48	72 Stunden
CEA nativ§	42	6	3	2	2
CEA-5oooo-M	23	7	17	1o	1o
CEA-5oooo-M pH 8,o Bhdlg.	16	5	1o	6	6
CEA-5oooo-M o.1 N NaOH Bhdlg.	31	12	5	2	2

+ : angegeben in 1/1oo mm

§ : Kontrollgruppe

Die Immunisierung der Mäuse mit CEA-5oooo-M führte zu einer weiteren Reduzierung der Arthusreaktion bei gleichbleibender bzw. verstärkter Immunreaktion vom verzögerten Typ. Die subtotale und die totale Abspaltung labiler Methylgruppen

dagegen führte zu einer Reduktion der verzögerten Immunreaktion, die nach Behandlung des CEA-5oooo-M in o.1 N NaOH aufgehoben ist. Es ist dabei allerdings nicht auszuschließen, daß die Behandlung des CEA-5oooo-M in der Natronlauge nicht doch zu einer weitgehenden Denaturierung entsprechender immunologischer Determinanten führt, so daß dann die Stimulierung spezifischer Lymphozyten nicht mehr erreicht werden kann. Das Resultat zeigt jedoch, daß zumindest ein Teil der labilen Estermethylbindungen des CEA für die selektive Induktion zellulärer Immunreaktionen verantwortlich ist.

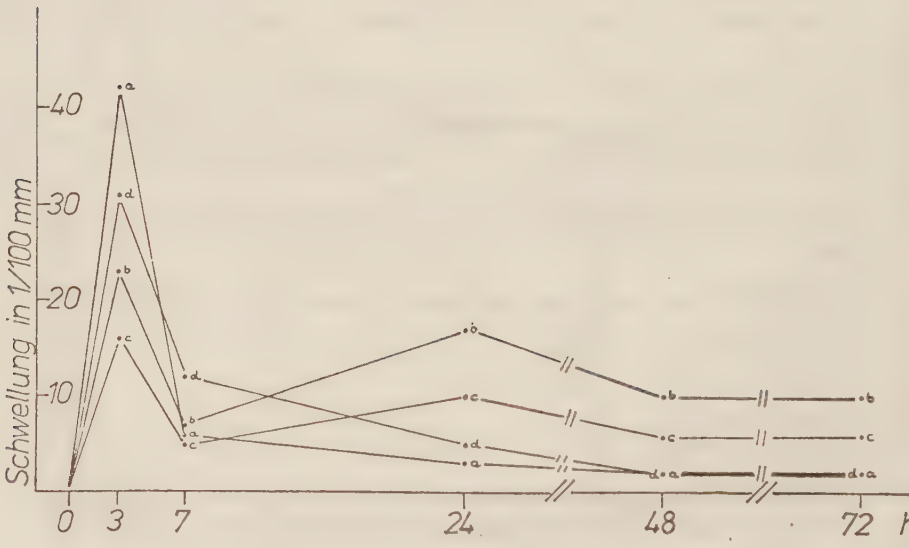


Abbildung 18: Verlauf der Pfotenschwellung während 72 Stunden nach intradermaler Injektion von 1o µg nativem CEA, 14 Tage nach Erstimmunisierung mit 5oo ng verschieden behandelten CEA-5oooo-M-Präp. Erstimmunisierung mit a) CEA nativ, b)CEA-5oooo-M, c) CEA-5oooo-M pH 8.o, d) CEA-5oooo-M o.1 N NaOH

5.) Serologische Untersuchungen

Die Untersuchung der Seren, die 8 Tage nach intradermaler Zweitinjektion des Antigens gewonnen wurden, dienten dem Nachweis von humoralen Antikörpern, die gegen das native CEA gerichtet waren. Die Bestimmung der Antikörper erfolgte mit einem Radioimmuntest. Die gemessenen Antikörperspiegel sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 13: Anti-CEA_{nativ}-Antikörper, gemessen in % der CEA-Bindung eines Präimmunserums, 8 Tage nach intradermaler Zweitinjektion von 1o µg nativem CEA

Erstimmunisation	Dosis (ng)	% Bindung	cpm
CEA nativ	5oo	344	55oo
	2o	231	37oo
	o.2	163	26oo
CEA-6oo-M	5oo	237	38oo
	2o	225	36oo
	o.2	156	25oo
CEA-6oo-Ac	5oo	188	3ooo
	2o	169	27oo
	o.2	163	26oo
CEA-6oo-Lau	5oo	744	19oo
	2o	169	27oo
	o.2	144	23oo
CEA-GMA-35	5oo	131	21oo
	2o	131	21oo
	o.2	119	19oo
CEA-MA-1oo/5ooo	5oo	144	23oo
	2o	138	22oo
	o.2	144	23oo
Praeimmunserum		1oo	16oo
CEA-5oooo-M	5oo	2o7	33oo
Roche Antiserum	1o µl	744	11900

Die Parallelität der Antikörperspiegel mit den jeweiligen gemessenen Arthusreaktionen ist in den Untersuchungen bestätigt worden. So nahm die Konzentration der Antikörper mit steigender Immunisierungsdosis zu, ein Befund der sich in verstärkter Pfotenschwellung 3 Stunden nach intradermaler Injektion des Antigens ausdrückt. Mit Ausnahme des Antikörperspiegels der Tiere nach Immunisation mit 5oo ng CEA-6oo-Lau hatten stets die Tiere der Kontrollgruppen die höchste spezifische Bindung für radioaktives CEA. Diese Tiere hatten im allgemeinen auch die stärksten Arthusreaktionen. Die Primärimmunisierung der Mäuse mit modifiziertem CEA erzeugte geringere Mengen an CEA_{nativ}-Antikörpern. Das Serum von Tieren, die mit CEA-GMA-35 immunisiert waren, zeigten generell den niedrigsten Spiegel an CEA-Antikörpern. Auch hier konnte der niedrigste Spiegel an CEA-Antikörpern mit der niedrigsten Arthusreaktion korreliert werden.
Da die Immunisierung mit modifiziertem CEA , trotz heterologer Zweitimmunisierung mit nativem CEA,zu einer deutlichen Verstärkung der verzögerten Immunreaktion führte, müssen für diese Induktion andere immunologische Antigendeterminanten eine Rolle spielen als für die Arthusreaktion. Dies gilt insbesondere für den Antikörperspiegel der Tiere, die mit 5oo ng CEA-5oooo-M immunisiert worden waren, der mit 2o7 % Bindung etwa der Hälfte der Kontrollgruppe entspricht; gleichzeitig wurde aber hier die ausgeprägteste Immunreaktion vom verzögerten Typ in dieser Gruppe gemessen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem in Abbildung 1o gegebenen Kreuzreaktivität für das CEA-5oooo-M . Eine um 5o% reduzierte Kreuzreaktivität des CEA-5oooo-M mit Anti-CEA-$_{nativ}$-Serum entspricht einem um ca. 5o % der Kontrollen reduzierten Antikörperspiegel nach Erstimmunisation mit diesem methylierten Antigen.

III. Diskussion

Immunologische Mechanismen zellulären und humoralen Typs spielen in der Erkennung und bei der Abwehr maligner Erkrankungen im Organismus eine vielfältige Rolle. Tumorantigene auf den Oberflächen der malignen Zellen stellen die entscheidenden Induktoren für die immunologische Tumorabwehr dar. Einerseits werden zelluläre Immunreaktionen, die verantwortlich sind für die immunologische Tumorabwehr, induziert, andererseits können aber gerade solche Antigene zu einer völligen Blockierung der Immunabwehr beitragen. So ist nach Untersuchungen von Hellström und Sjögren (2o) bekannt, daß insbesondere Tumorantigen-Antikörperkomplexe als Verursacher dieser Blockierung zu sehen sind. Die Beeinflussung der Immunogenität von Tumorantigenen gewinnt in diesem Zusammenhang großes Interesse.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß verschiedene Proteinantigene durch chemische Modifikation derart in ihrer Struktur abgeändert werden konnten, daß nach Immunisation mit solchen Antigenen zelluläre Immunreaktionen bevorzugt induziert wurden(38,42).Die Übertragung dieser Ergebnisse auf Tumorantigene könnte ein wichtiger Schritt in Richtung auf eine effektive Immuntherapie bedeuten. Die selektive Induktion zellulärer Immunreaktionen durch gezielte Manipulationen des Tumorantigens stellt in dieser Hinsicht den ersten Schritt dar, der es ermöglicht, die Tumorabwehr des Organismus gezielt zu beeinflussen.
In der vorliegenden Arbeit wurden für das tumorassoziierte Antigen CEA chemisch-enzymatische Modifikationsverfahren entwickelt, die zu einer selektiven Stimulierung zellulärer Immunreaktionen bei gleichzeitig reduzierter Antikörperinduktion führte. Die Immunogenität der modifizierten CEA-Präparate wurde in Mäusen untersucht.

Da CEA bei den meisten wichtigen humanen Tumoren nachweisbar ist - ca. 50% aller humanen malignen Tumoren exprimieren CEA - erscheint es besonders lohnenswert, die Immunogenität dieses Antigens zu untersuchen. Hinweise für eine Verstärkung der Immunogenität dieses Antigens konnte in einer kürzlich publizierten Arbeit (8) gefunden werden. Die Immunisierung von Meerschweinchen mit acetoacetyliertem CEA resultierte in verstärkten zellulären Immunreaktionen. In der vorliegenden Untersuchung waren verstärkte zelluläre Immunreaktion besonders dann nachweisbar, wenn zur Immunisierung methylierte oder acetylierte CEA Präparate Verwendung fanden. Dieser Effekt war dosisabhängig und konnte gesteigert werden, wenn höhere Dosen der modifizierten CEA Präparate zur Erstimmunisierung Verwendung fanden. Bei Immunisierung der Versuchstiere mit Dosen von 500 ng modifiziertem Antigen, zeigten auch die anderen Modifikationen des CEA schwache Immunreaktionen vom verzögerten Typ. Besonders vermerkt werden muß, daß dieser Induktionseffekt für zelluläre Immunreaktionen immer dann zu beobachten war, wenn die Zweitimmunisierung mit heterologem Antigen erfolgte. Diese Beobachtung bestätigte sich darin, daß bei Erstimmunisierung mit nativem CEA und heterologer Zweitimmunisierung mit methyliertem CEA ebenfalls eine zelluläre Immunreaktion gemessen werden konnte.

Bei den in vivo Untersuchungen führte die heterologe Zweitinjektion im allgemeinen zu reduzierter humoraler Immunreaktion (Arthusreaktion)im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dieser Befund konnte durch die serologischen Untersuchungen voll bestätigt werden. Der einzigen Diskrepanz, ein mit 798% Bindung sehr hoher Antikörperspiegel in Tieren, die mit 500 ng lauryliertem CEA immunisiert worden waren, entspricht auch eine sehr ausgeprägte Arthusreaktion, die nur geringfügig unter der Reaktion der Kontrolltiere lag. Hier muß allerdings daran gedacht werden, daß bei Schwellung der Mäusepfoten auf

4o/1oo mm möglicherweise keine lineare Beziehung mehr zwischen Antikörperspiegel und 3-Stunden-Entzündungsreaktion besteht. Dieser Schwellungswert könnte einen Art Grenzwert darstellen, besonders muß dies vermutet werden, da nach Mehrfachimmunisierung im Hinblick auf Pfotendicke keine weitere Steigerung der Arthusreaktion gemessen werden konnte, wohl aber eine insgesamt verlängerte Phase der Arthusreaktion, die deshalb nur schwer von der zellulären Phase der Immunreaktion abgegrenzt werden konnte.
Diese Ergebnisse deuten auf eine inverse Beziehung zwischen antikörpervermittelten Immunreaktionen und Immunreaktionen des verzögerten Typs hin, wie sie bereits von Liew und Parish beschrieben worden sind (32). Bei der chemischen Modifikation des CEA sind offensichtlich die immunologischen Determinanten, die für die humoralen Immunreaktionen verantwortlich sind, empfindlicher für eine "Strukturverfremdung" als die Determinanten, die zelluläre Immunreaktionen auslösen. Die Spezifitätsverschiebung durch die chemische Modifikation führte dazu, daß die heterologe Folgeimmunisierung mit nativem CEA keine Stimulation sensiblisierter Lymphocyten mehr hervorruft.
Die Beziehung ist besonders deutlich an der Abhängigkeit der Höhe des durch Immunisierung erzeugten Antikörperspiegels vom Methylierungsgrad des CEA sichtbar. Im Falle der Immunisierung mit 5oo ng starkmethyliertem CEA stellt man gegenüber dem schwachmethylierten CEA eine weiter reduzierte Arthusreaktion fest, bei gleichbleibender bzw. verstärkter Immunreaktion vom verzögerten Typ. Die serologische Untersuchung dieser Seren ergab korrespondierende Resultate.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Immunogenität des CEA nach chemischer Modifikation, bestätigen vorausgehende Befunde, die nach Modifikation von Proteinantigenen und Membranfraktionen gewonnen wurden. Eine erhöhte Verfremdung des CEA durch vermehrte Einführung von Methylgruppen konnte die Fähigkeit

zur selektiven Stimulation zellulärer Immunreaktionen in Mäusen noch verstärken. Eine solche weitere Erhöhung der Anzahl der eingeführten Gruppen, insbesondere die Einführung von Methyl- und Acetylgruppen, könnte möglicherweise bei gänzlich fehlender Antikörperbildung, nur noch zelluläre Immunreaktionen hervorrufen.

Die Immunogenität des CEA im menschlichen Organismus ist umstritten (12,36). In einigen Untersuchungen wurden CEA Immunkomplexe im Blut von Tumorpatienten nachgewiesen, die nach eingangs genannten Untersuchungen zu einer Blockierung der Tumorabwehr führen könnten (14,23).
Eine selektive Induktion zellulärer Immunmechanismen durch eine noch verbesserte chemische Modifikation des CEA im menschlichen Organismus könnte neue Wege einer spezifischen Immuntherapie für zahlreiche Karzinompatienten eröffnen.

IV. Zusammenfassung

Carcinoembryonales Antigen (CEA) wurde nach einem neuentwickelten 5 Stufen-Verfahren aus Lebermetastasen humaner kolorektaler Tumoren dargestellt. Verschiedene chemische und immunologische Untersuchungen des Antigens bestätigten die Reinheit des so präparierten CEA.
In den weiteren Untersuchungen wurden geeignete chemische Modifikationsverfahren für das CEA gefunden, die selektiv die Stimulierung von Immunreaktionen des verzögerten Typs bewirkten. Das CEA wurde dabei mit insgesamt 6 verschiedenen chemischen Reagenzien sowie enzymatisch durch Behandlung mit Neuraminidase modifiziert. Die durch die Antigenmodifikation bewirkte Änderung der Immunogenität wurde in vivo an STU Mäusen durch den Pfotenschwelltest gemessen. Der Test bewertet sowohl die Antikörper-vermittelte-Immunreaktion (Arthusreaktion) als auch die Immunreaktion vom verzögerten Typ. Zur Beurteilung der humoralen Immunreaktion wurden zusätzlich noch serologische Untersuchungen durchgeführt.
Bei den in vivo Untersuchungen fanden sich insbesondere im Hinblick auf Immunreaktionen des zellulären Typs (verzögerte Immunreaktionen) wesentliche Unterschiede im Vergleich zum nativen CEA. So wurden bei heterologer Zweitimmunisierung verstärkt Immunreaktionen des verzögerten Typs induziert. Insbesondere nach Primärimmunisierung mit methyliertem und acetyliertem CEA (CEA-600-M , CEA-50000-M und CEA-600-Ac) und Zweitimmunisierung mit nativem CEA (heterologe Zweitimmunisierung) beobachtete man diese Induktion zellulärer Immunreaktionen. Diese selektive Steigerung zellulärer Immunreaktionen bei gleichzeitig verminderter humoraler Immunreaktion konnte zumindest bei dem methylierten CEA Präparat teilweise auf Methylestergruppen zurückgeführt werden.
Am Beispiel des methylierten CEA konnte darüberhinaus nachge-

wiesen werden, daß mit zunehmendem Methylierungsgrad des CEA-Präparates, bei anhaltender selektiver Induktion zellulärer Immunreaktionen, die humorale Immunantwort in Form kreuzreagierender Antikörper weiter vermindert wird. Durch die serologischen Untersuchungen ließ sich zeigen, daß nach Immunisierung von Mäusen mit modifiziertem CEA die Antikörper, die mit nativem CEA kreuzreagieren, deutlich vermindert sind.

V. Material und Methoden

1.) Geräte:

Spektralphotometer Zeiss PS Q III, Carl Zeiss, Oberkochem
PH-Meter, Beckmann 356o, Beckmann, Palo Alto, Cal., USA
PH- Stat, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Szintillationsmeßgerät, Packard Tri Carb Modell 3375, Downers Grove, Ill., USA
Fraktionssammler, Serva Linear II mit Signalgeber STZ, Serva, Heidelberg
Aminosäureanalysator, Beckmann, Modell 12o C, Palo Alto, Cal., USA
Beckmann, präparative Ultrazentrifuge Spinco L 25o B mit SW 4o Rotor, Rotor Typ 21 und Rotor Typ 3o, Palo Alto, Cal., USA
Minifuge, Heraeus-Christ, Osterode
Kühlzentrifuge, Stock, Marburg
Eppendorf Tischzentrifuge 32oo, Eppendorf Gerätebau Hamburg
Gelscanner, Gilford 25o, Gilford Instruments, Oberlin, Ohio, USA
Amicon Ultrafiltrationskammer Modell 4o2 mit PH 3o und CM Filtern, Amicon Corp., Lexington, Mass., USA
A o2 T Schnelltaster, Kröplin, Schlüchtern
Mikroliterspritzen N 7o5, Hamilton, Den Haag, Holland

2.) Chemikalien:

Wenn nicht anders angegeben, sind die in den Experimenten verwendeten Chemikalien p.A. von E. Merck, Darmstadt.
1-Äthyl-3 (3-Dimethylaminopropyl)- Carbodiimid: The Ott Chemical Company, Muskegon, Mich., USA

14-C-Dimethylsulfat: Amersham Buchler, das 14-C-Dimethylsulfat wurde mit Dimethylsulfat auf 2,9 x $1o^7$ cpm/mMol verdünnt.

Säulenmaterial: Ultrogel LKB AcA 22, LKB, Bromma, Schweden
Sephadex G 2oo und Sepharose 6 B, Pharmacia, Uppsala, Schweden

Dialysierschläuche: Viskingschläuche, Serva, Heidelberg

Reagenzien für den CEA-Radioimmuntest: CEA (Roche) RIA-Test, Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz

125-J-CEA: Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz

Anti-CEA_{nativ}-Serum: Ziegenantiserum, gewonnen nach dreimaliger Immunisierung mit je 5 mg CEA (Präparationsstufe 5)

Anti-CEA_{nativ}-Serum: Ziegenantiserum, gewonnen nach dreimaliger Immunisierung mit je 5 mg CEA der Präparationsstufe 3.

3.) Tiere:
STU-Mäuse, 1o5. bis 1o8. Inzuchtgeneration (13).

4.) Gelpermation:
Es wurden Glassäulen mit 16o x 6,5 cm und 9o x 2 cm Länge benutzt. Als Chromatographiematerial diente Ultrogel LKB AcA 22. Fraktionsgrößen von 3oo bzw. 6o Tropfen wurden gesammelt. Alle gelchromatographischen Arbeiten wurden bei 5°C durchgeführt.

5.) Polyacrylamidgelelektrophoresen:
Die Elektrophorese von Proteinen wurde in 5% Polyacrylamidgelen (5 x 9o mm) nach Weber und Osborn (5o) durchgeführt. Die Gele wurden in 25 % Isopropanol 15 Minuten bei 5o°C und über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und mit o,25% Coomasie Blue R 25o angefärbt. Die Gele wurden mit 7% Essigsäure entfärbt und dann in derselben Lösung aufbewahrt. Die Gele wurden mit einem Gilford Gel-Scanner bei einer Wellenlänge von 55o nm densitometriert.

6.) Molekulargewichtsbestimmung durch Säulenchromatographie:
Die Molekulargewichtsbestimmung wurde nach P. Andrews mit Sephadex G 2oo durchgeführt. Das Molekulargewicht wurde durch Vergleich einer Elutionswerte von Standardproteinen an hand der Eichkurve in Abbildung 19 ermittelt.

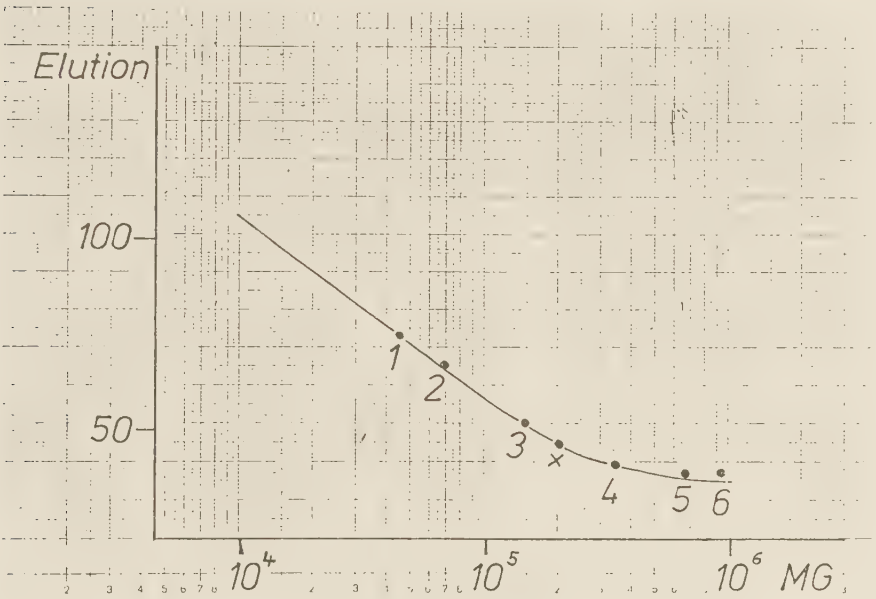


Abbildung 19 : Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung von CEA durch Sephadex G 2oo Gelchromatographie. 1 = Ovalbumin, 2 = Rinderserumalbumin, 3 = Immunglobulin G, 4 = Ferritin, 5 = Thyreoglobulin, 6 = Immunglobulin M, X = CEA

7.) Molekulargewichtsbestimmung durch SDS Polyacrylamidgelelektrophorese:
Das Molekulargewicht des CEA wurde durch Vergleich der Rf-

Werte in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit der in Abbildung 2o wiedergegebenen Eichkurve ermittelt.

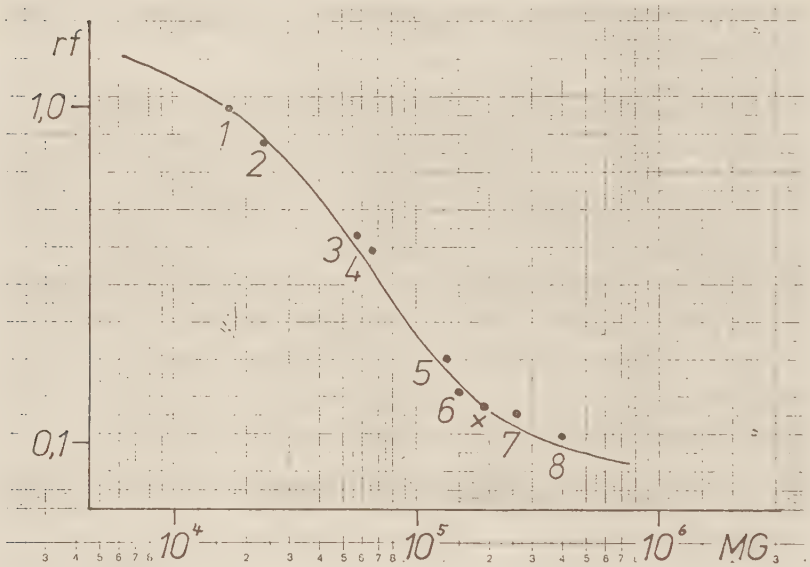


Abbildung 2o :Eichkurve für Molekulargewichtsbestimmung von CEA in 5% Gelen. 1 = Tabak Mosaik Virus Protein, 2 = Immunglobulin G L-Kette (IgG), 3 = IgG H-Kette, 4 = Rinderserumalbumin (BSA) (Monomer), 5 = BSA (Dimer), 6 = IgG undissoziiert, 7 = BSA (Tetramer), 8 = BSA (Hexamer) x = CEA

ß.) Immundiffusion nach Ouchterlony:
Das Gel wurde mit 1,o % Agarose in PBS mit einem Zusatz von o,o2 % Natriumazid hergestellt. Die Diffusionsdauer betrug 2 Tage bei Raumtemperatur. Das Gel wurde dann 3 Tage bei täglich mehrmaligem Pufferwechsel mit PBS ge-

waschen, dann noch 4 Stunden mit Wasser gespült. Die Anfärbung der Präzipitationsbanden erfolgte mit einer o,25% CoomasieBrilliant Blue R 25o Lösung. Mit 7%iger Essigsäure wird überschüssiges Coomasie Blue ausgewaschen.

9.) Autoradiographie:
Ouchterlonygele wurden im Luftstrom getrocknet und auf Osram-Röntgenfilme gelegt. Die Röntgenfilme wurden nach 3-tägiger Belichtung durch 125-J-CEA durch 1o-minütiges Eintauchen in Roentogen/Wasser 1o:35 entwickelt. Die Fixierung erfolgte durch 3o-minütiges Eintauchen in eine Lösung von 2oo g $Na_2S_2O_3$ und 2o g $Na_2S_2O_5$ in 1 l Wasser.

1o.) Proteinbestimmung:
Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Folin (34).

11.) Aminosäureanalyse:
Das CEA wurde dazu in 6 N HCL 24 Stunden bei 11o°C totalhydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Exsikkator über NaOH getrocknet und in 1 ml o,2 m Natriumcitratpuffer pH 2,2 gelöst und auf die Ionenaustauschsäulen des Aminosäurenanalysators aufgetragen.

12.) Radioaktivitätsmessungen:
Als Zähllösung diente ein Dioxanszintillator folgender Zusammensetzung 8 g PPO, o,4 g POPOP, 12o g Naphtalin, 4o ml Äthylenglykol, mit Dioxan auf 2 l auffüllen.

13.) CEA Radioimmuntest:
Die Bestimmung des CEA erfolgte mit dem CEA (Roche) RIA-Test nach dem Kopräzipitations-Hemmungs-Prinzip entsprechend den Testbedingungen. Das CEA wurde dabei

jedoch nicht durch Perchlorsäure extrahiert, sondern direkt bestimmt.

14.) Acetylierung des CEA:
Die Modifikationsreaktion wurde unter Standardreaktionsbedingungen bei 25°C am Titrator durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug bei 600-fachem molaren Überschuß an Acetanhydrid 15 Minuten. Nach der Dialyse wurde das acetylierte CEA bis zur Immunisierung eingefroren.

15.) Laurylierung des CEA:
CEA wurde unter Standardreaktionsbedingungen bei 40°C, 30 Minuten mit einem 600-fachem molaren Überschuß an Laurylsäurechlorid zur Reaktion gebracht. Nach extensiver Dialyse wurde das laurylierte CEA bis zur Immunisierung eingefroren.

16.) Methylamidierung des CEA:
Das CEA wurde dabei unter Standardreaktionsbedingungen mit einem 100-fachem molaren Überschuß an 1-Äthyl-3 (3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und einem 5000-fachem molaren Überschuß an Methylamin (MA) 3 Stunden bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Umsetzung diente der Methylamidierung freier Carboxylgruppen des Moleküls. Als Nebenreaktion kann es zu inter- und intramolekularen Vernetzungen kommen.
Das methylamidierte CEA wurde dialysiert und bis zur Immunisierung bei -20°C eingefroren.

17.) Reaktion des CEA mit Glutardialdehyd und anschließende Methylamidierung:
Bei dieser kombinierten Modifikationsreaktion wurde das CEA unter Standardreaktionsbedingungen zunächst mit dem 35000-fachen Überschuß Glutardialdehyd behandelt. Die sich anschließende Umsetzung mit Carbodiimid/Methylamin

erfolgte nach den obengenannten Bedingungen. Das modifizierte CEA Präparat wurde bis zur Immunisierung bei -2o°C eingefroren.

18.) Immunisierung der Mäuse:
Die Primärimmunisierung (Sekundärimmunisierung) der Tiere erfolgte durch subcutane Injektion des Antigens in die Flanke. Die Sekundärimmunisierung (Tertiärimmunisierung) erfolgte intradermal in den medialen Anteil der Planta pedis der Tiere mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Die Tiere wurden 8 Tage nach der letzten Immunisierung durch Punktion des Retroorbitalsinus geblutet, dabei wurden ca. o,3 ml Blut entnommen.

19.) Immunisierung der Ziegen:
Die Ziegen wurden mit 5 mg Antigen (CEA Präparationsstufe 5 oder CEA Präparationsstufe 3) subcutan im Bereich der hinteren Extremität immunisiert. Das Antigen wurde zusammen mit Kompletten Freund's Adjuvant injiziert. In 6-wöchigem Abstand wurden die Tiere mit 5 mg Antigen reimmunisiert und 1o Tage nach der dritten Injektion durch Punktion der Vena jugularis externa geblutet, dabei wurde 5o ml Blut entnommen.

2o.) Bestimmung von Anti-CEA_{nativ}-Antikörpern:
Die Mäuseindividualseren einer Gruppe wurden vereinigt. Das so gewonnene Gesamtserum wurde 1:1o mit o,2 m EDTA Puffer verdünnt und dann getestet. Hierzu wurden 1oo µl des Antiserums mit 5 µl 125-J-CEA in 2 ml o,2 ml EDTA Puffer bei Raumtemperatur 1 Tag inkubiert und der Anteil des gebundenen 125-J-CEA mit Zirkonylphosphatgel (22) bestimmt. Die Höhe des Antikörperspiegels wurde als Prozentzahl der Bindung eines Präimmunserums nach folgender Formel angegeben:

$$\frac{\text{cpm Antiserum}}{\text{cpm Präimmunserum}} \times 1oo.$$

21.) Schwellungsmessung der Mäusehinterpfoten:
Die Schwellung der Mäusepfoten wird mit einem Foliendickenmeßgerät bestimmt (9). In 6 bis 8 Meßgängen, linker Fuß gegen rechten Fuß und umgekehrt, wird die Schwellung der Füsse ermittelt. Die im Text angegebenen Differenzen ergeben sich aus den Mittelwerten dieser Meßreihen.

IV. Literatur

1. Andrews P.: Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J., 91, 222-223 (1964)

2. Baldwin W.R.: Immunological aspects of chemical carcinogenesis. Adv. Cancer Res., 18, 1-75 (1973)

3. Baldwin W.R., Price M.R., Robins P.A.: Blocking of lymphocyte mediated cytotoxicity for hepatoma cells by tumor-specific antigen-antibody complexes.Nat.N.Biol.,238,185-187 (1972)

4. Bansal B.R., Mark R.,Rhoads J.R., Bansal S.C.: Effect of embryonic tissue immunization on chemically induced gastrointestinal tumors in rats: I.Can embryonic antigens act as rejection antigens? J.Nat.Canc.Inst. 61, 189-201 (1978)

5. Brawn R.J.: Possible association of embryonal antigens(s) with several primary 3-methyl-cholanthrene-induced murine sarcomas. Int. J.Cancer 6, 245-249 (1970)

6. Bubenik J., Perlmann P., Helmstein K., Mohberger I.G.: Cellular and humoral immune response to human urinary bladder carcinomas. Int. J.Cancer, 5, 310-319 (1970)

7. Burnet F.M.: Immunological Surveillance, Pergamon Press, Syndney (1970)

8. Chao H.F., Peiper S.C., Aach R.D., Parker C.W.: Introduction of cellular immunity to a chemically altered tumor antigen. J.Immunol., 111, 1800-1803 (1973)

9. Chase M.W.: Animal handling; in Chase W.M., Williams C.A.: Methods in immunology and immunochemistry, 1, 288-289, Acad.Press, New York (1967)

10. Coggin J.H.,Ambrose K.R., Anderson N.G.: Fetal antigen capable of inducing transplantation immunity against SV 40 hamster tumor cells. J.Immunol., 105, 524-526 (1970)

11. Coligan J.E., Lautenschleger J.T., Egan M.L., Todd C.W.: Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. Immunochem. 9, 377-386 (1972)

12. Collatz E., Von Kleist S., Burtin P.: Further investigations of circulating antibodies in colon cancer patients: On the autoantigenicity of the carcinoembryonic antigen. Int. J.Cancer, 8, 298-303 (1971)

13. Committee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of mice: Standardized nomenclature for inbred Strains of mice: Fourth listing. Canc.Res., 28, 391-420 (1968)

14. Constanza M.E., Pinn V., Schwartz R.S., Nathanson L.: Carcinoembryonic antigen-antibody complexes in a patient with colonic carcinoma and nephrotic syndrome. N.Engl.J.Med., 289, 520-522 (1973)

15. De Vries J.E., Rümke P., Bernheim J.L.: Cytotoxic lymphocytes in meolanoma-patients. Int.J.Cancer, 9, 567-576 (1972)

16. Fuks A., Banjo C., Shuster J., Freedman S.O., Gold P.: Carcinoembryonic antigen (CEA): Molecular biology and clinical significance. Bioch.Biophys.Acta, 417, 123-152 (1974)

17. Gold J.M., Freedman S.O., Gold P.: Human anti-CEA antibodies detected by radioimmunoassay. Nat.N.Biol.239, 60-62 (1972)

18. Gold P., Freedman S.O.: Demonstration of tumorspecific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J.Exp.Med., 121, 439-462 (1965)

19. Hellström I., Hellström K.E.: Studies on cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Moloney-Virus-induced mouse sarcomas. In.J.Cancer, 4, 587-6oo (1969)

2o. Hellström I., Hellström K.E., Sjögren H.O.: Serum mediated inhibition of cellular immunity to methyl-cholanthrene-induced murine sarcomas. Cell.Immunol., 1, 18-3o (197o)

21. Hellström I., Hellström K.E., Sjögren H.O., Warner G.A.: Demonstration of cell mediated immunity to human neoplasms of various histological types. Int.J.Cancer,7, 1-16 (1971)

22. Hoffmann-La Roche: CEA RIA Test. Anleitung zur Durchführung; F. Hoffmann-La Roche Diagnostica, Basel, Schweiz (1978)

23. Kapsopoulou-Dominos K., Anderer F.A.: Circulating carcinoembryonic antigen immune complexes in sera of patients with carcinomata of the gastrointestinal tract. Clin. exp.Immunol., 35, 19o-195 (1979)

24. Klein G.: Tumor antigens. Ann.Rev.Mikrobiol., 2o, 223-252 (1966)

25. Klein G.: Immunological aspects of Burkitt's lymphoma. Adv.Immunol., 14, 187-25o (1971)

26. Krupey J., Gold P., Freedman S.O.: Purification and characterization of the carcinoembryonic antigens of thehuman digestive system. Nat.N.Biol., 215, 67-68 (1967)

27. Krupey J., Gold P., Freedman S.O.: Physicochemical studies of the carcino-embryonic antigens of the human digestive system. J.Exp.Med., 128, 387-398 (1968)

28. Krupey J., Wilson T., Freedman S.O., Gold P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissues. Immunochem., 9, 617-622 (1972)

29. Laurence D.J.R., Tuberville C., Anderson S.G., Neville A.M.: First British standard for carcinoembryonic antigen (CEA)Br.J.Cancer, 32, 295-299 (1975)

3o. Lausch R.N., Rapp F.: Tumor specific antigens and re-expression of fetal antigens in mammalian cells. Progr.Exp.Tumor Res., 19, 45-58 (1974)

31. Lejtenyi M.C., Freedman S.O., Gold P.: Response of lymphocytes from patients with gastrointestinal cancer to the carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Cancer, 28, 115-12o (1971)

32. Liew F.Y., Parish C.R.: Regulation of the immune response by antibody.I.Suppression of antibody

formation and concomitant enhancement of cell-mediated immunity by passive antibody. Cell.Immunol., 4, 66-85 (1972)

33. Lo Gerfo P., Herter F.P., Bennett S.J.: Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. Int.J. Cancer 9, 344-348 (1972)

34. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193, 265-275 (1951)

35. Mach J.P., Pusztaszeri G.: Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. Immunochem., 9, 1031-1034 (1972)

36. Mac Sween J.M.: The antigenicity of carcinoembryonic antigen in man. Int.J.Cancer, 15, 246-252 (1975)

37. Old L.J., Boyse E.A.: Immunology of experimental tumors. Ann.Rev.Med., 15, 167-186 (1964)

38. Parish C.R.: Immune response to chemically modified flagellin: Induction of antibody tolerance to flagellin by acetoacetylated derivatives of the protein. J.Exp. Med., 134, 1-20 (1971)

39. Parish C.R.: Immune response to chemically modified flagellin: II.Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity. J.Exp.Med., 134, 21-47 (1971)

4o. Parish C.R.: Immune response to chemically modified flagellin: IV.Further studies on the relationship between humoral and cellmediated immunity. Cell. Immunol., 6, 66-79 (1973)

41. Rosai J., Tillack T.W., Marchesi V.T.: Membrane antigens of human colonic carcinoma and non-tumoral colonic mucosa:Results obtained with a new isolation method. Int.J.Cancer, 1o, 357-367 (1972)

42. Staab H.-J., Anderer F.A.: Structure and immunogenic behaviour of methylated Tobacco Mosaic Virus. Bioch. Biophys.Acta, 427, 453-464 (1976)

43. Staab H.-J., Anderer F.A.: Immunogenicity of tumour cells modified with various chemicals. Br.J.Cancer, 35, 395-4o2 (1977)

44. Staab H.-J., Anderer F.A.: Chemical modification and immunogenicity of membrane fractions from mouse tumour cells. Br.J.Cancer, 38, 496-5o2 (1978)

45. Terry W.D., Henkart P.A., Coligan J.E., Todd C.W.: Carcinoembryonic antigen: Characterization and clinical application. Transpl. Rev., 2o, 1oo-129 (1974)

46. Thompsen K., Harris M., Benjamini E.: Cellular and humoral immunity: A distinction in antigenic recognition. Nat.N.Biol., 238, 2o-21 (1972)

47. Thomsen D.M., Krupey J., Freedman S.O., Gold P.: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 64, 161-167 (1969)

48. Vasudevan D.M., Balakrishnan K., Talwar G.P.: Effect of neuraminidase on the electrophoretic mobility and immune cytolysis of human uterine cervix carcinoma cells. Int.J.Cancer, 6, 506-516 (1970)

49. Von Kleist S., Chavanel G., Burtin P.: Identification of an antigen from normal human tissue that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen. Proc.Nat. Acad.Sci. U.S.A., 69, 2492-2494 (1974)

50. Weber K., Osborn M.: Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures; in Neurath H., Hill R.J.: The Proteins, 3. Auflage, Seite 279-223 Acad.Press, New York (1975)

Ich danke Herrn Professor Dr. R. Fischer für den Vorschlag des Themas und sein Interesse am Fortschritt der Arbeit. Herrn Prof. Dr.F.A. Anderer danke ich für die Beratung und Diskussion, Fräulein S. Glock für die Mithilfe bei den tierexperimentellen Arbeiten. Der Max-Planck-Gesellschaft gilt mein Dank für großzügige gerätetechnische Unterstützung.

Am 13.2.1949 wurde ich, Hans-Jürgen Staab, als Sohn des Ernst Staab und der Liselotte Staab, geb. Kunkel in Schöllkrippen geboren. Das Abitur legte ich am 22.6.1967 an der Goetheschule in Dieburg ab. Von 1967 bis 1973 studierte ich Biochemie an der Universität Tübingen und legte 1974 die Diplomprüfung in physiologischer Chemie und Biochemie ab. 1976 promovierte ich zum Dr.rer.nat. bei Herrn Prof.Dr. F.A. Anderer. Von 1971 bis 1978 studierte ich Medizin an der Universität Tübingen und bestand das Staatsexamen am 2o. Dezember 1978. Von Dezember 1977 bis November 1978 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.R.Fischer an meiner medizinischen Dissertation über das Thema "Untersuchungen zur Immunogenität von nativem und modifiziertem carcinoembryonalen Antigen (CEA) in STU-Mäusen".

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321